



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 348 500**

(51) Int. Cl.:

A61K 31/00 (2006.01)

A61K 31/4745 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **04731150 .1**

(96) Fecha de presentación : **05.05.2004**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1620082**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **18.11.2004**

(54) Título: **Uso médico de inhibidores de glutaminil y glutamato ciclasas para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer y el Síndrome de Down.**

(30) Prioridad: **05.05.2003 US 468043 P**
05.05.2003 US 468014 P
15.10.2003 US 512038 P

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
07.12.2010

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
07.12.2010

(73) Titular/es: **Probiodrug AG.**
Weinbergweg 22
06120 Halle/Saale, DE

(72) Inventor/es: **Demuth, Hans-Ulrich;**
Hoffmann, Torsten;
Schilling, Stephan;
Niestroj, Andre, J. y
Heiser, Ulrich

(74) Agente: **Arias Sanz, Juan**

ES 2 348 500 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Uso médico de inhibidores de glutaminil y glutamato ciclasas para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer y el síndrome de Down.

5

Campo de la invención

La invención se refiere a glutaminil ciclasa (QC, EC 2.3.2.5) que cataliza la ciclación intramolecular de restos de glutamina N-terminales a ácido piroglutámico (5-oxoprolina, pGlu*) con liberación de amoníaco y la ciclación intramolecular de restos de glutamato N-terminales a ácido piroglutámico con liberación de agua.

La presente invención identifica las QC de mamífero como metaloenzimas, proporciona sustratos fisiológicos novedosos de QC en mamíferos y el uso de inhibidores de QC y composiciones farmacéuticas que comprenden inhibidores de QC para el tratamiento de afecciones que pueden tratarse mediante la modulación de la actividad de QC. Adicionalmente, se muestra que la interacción metálica es un enfoque útil para el desarrollo de inhibidores de QC.

En una realización preferida, la presente invención proporciona el uso de inhibidores de la actividad de QC en combinación con inhibidores de DP IV o enzimas tipo DP IV para el tratamiento o el alivio de afecciones que pueden tratarse mediante la modulación de la actividad de QC y/o DP IV.

Antecedentes

La glutaminil ciclasa (QC, EC 2.3.2.5) cataliza la ciclación intramolecular de restos de glutamina N-terminales a ácido piroglutámico (pGlu*) liberando amoníaco. Messer aisló por primera vez una QC a partir del látex de la planta tropical *Carica papaya* en 1963 (Messer, M. 1963 Nature 4874, 1299). 24 años después, se descubrió una actividad enzimática correspondiente en pituitaria animal (Busby, W. H. J. y col. 1987 J. Biol. Chem. 262, 8532-8536; Fischer, W. H. y Spiess, J. 1987 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 3628-3632). Para la QC de mamífero, ha

podido demostrarse la conversión de Gln en pGlu por QC para los precursores de TRH y GnRH (Busby, W. H. J. y col. 1987 J. Biol. Chem. 262, 8532-8536; Fischer, W. H. y Spiess, J. 1987 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 3628-3632). Además, los
5 experimentos de localización iniciales de QC revelaron una localización simultánea con sus presuntos productos de catálisis en pituitaria bovina, mejorando además la función sugerida en la síntesis de hormona peptídica (Bockers, T. M. y col. 1995 J. Neuroendocrinol. 7, 445-453). En
10 contraposición, la función fisiológica de la QC de planta es menos clara. En el caso de la enzima de *C. papaya*, se ha sugerido un papel en la defensa de la planta contra microorganismos patogénicos (El Moussaoui, A. y col. 2001 Cell. Mol. Life Sci. 58, 556-570). Se han identificado
15 recientemente presuntas QC de otras plantas mediante comparaciones de secuencia (Dahl, S. W. y col. 2000 Protein Expr. Purif. 20, 27-36). Sin embargo, la función fisiológica de estas enzimas sigue siendo ambigua.

Las QC conocidas de plantas y animales muestran una
20 especificidad estricta por L-glutamina en la posición N-terminal de los sustratos y se ha encontrado que su comportamiento cinético obedece la ecuación de Michaelis-Menten (Pohl, T. y col. 1991 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 10059-10063; Consalvo, A. P. y col. 1988 Anal. Biochem.
25 175, 131-138; Gololobov, M. Y. y col. 1996 Biol. Chem. Hoppe Seyler 377, 395-398). Sin embargo, una comparación de las estructuras primarias de las QC de *C. papaya* y las de la QC altamente conservada de mamíferos no reveló ninguna homología de secuencia (Dahl, S. W. y col. 2000 Protein
30 Expr. Purif. 20, 27-36). Mientras que las QC de planta parecen pertenecer a una nueva familia de enzimas (Dahl, S. W. y col. 2000 Protein Expr. Purif. 20, 27-36), se encontró que las QC de mamífero tenían una pronunciada homología de secuencia con aminopeptidasas bacterianas (Bateman, R. C. y
35 col. 2001 Biochemistry 40, 11246-11250), conduciendo a la conclusión de que las QC de plantas y animales tienen diferentes orígenes evolutivos.

El documento EP 02011349.4 da a conocer polinucleótidos que codifican glutaminil ciclasa de insecto, así como los polipéptidos así codificados. Esta solicitud proporciona además células hospedadoras que comprenden vectores de expresión que comprenden polinucleótidos de la invención. Los polipéptidos aislados y células hospedadoras que comprenden QC de insecto son útiles en procedimientos de barrido de agentes que reduzcan la actividad glutaminil ciclasa. Dichos agentes se describen como útiles como plaguicidas.

La enfermedad de Alzheimer (EA) se caracteriza por una acumulación anormal de placas amiloidóticas extracelulares estrechamente asociadas a neuronas distróficas, astrocitos y microglia reactivos (Terry, R. D. y Katzman, R. 1983 Ann. Neurol. 14, 497-506; Glenner, G. G. y Wong, C. W. 1984 Biochem. Biophys. Res. Comm. 120, 885-890; Intagaki, S. y col. 1989 J. Neuroimmunol. 24, 173-182; Funato, H. y col. 1998 Am. J. Pathol. 152, 983-992; Selkoe, D. J. 2001 Physiol. Rev. 81, 741-766). Los péptidos β -amiloides ($A\beta$) son los componentes principales de las placas seniles y se considera que están directamente implicados en la patogénesis y progresión de la EA, una hipótesis apoyada por estudios genéticos (Glenner, G. G. y Wong, C. W. 1984 Biochem. Biophys. Res. Comm. 120, 885-890; Borchelt, D. R. y col. 1996 Neuron 17, 1005-1013; Lemere, C. A. y col. 1996 Nat. Med. 2, 1146-1150; Mann, D. M. e Iwatsubo, T. 1996 Neurodegeneration 5, 115-120; Citron, M. y col. 1997 Nat. Med. 3, 67-72; Selkoe, D. J. 2001 Physiol. Rev. 81, 741-766). El $A\beta$ se genera mediante procesamiento proteolítico de la proteína precursora β -amiloide (APP) (Kang, J. y col. 1987 Nature 325, 733-736; Selkoe, D. J. 1998 Trends Cell. Biol. 8, 447-453), que se escinde secuencialmente por β -secretasa en el extremo N y por γ -secretasa en el extremo C de $A\beta$ (Haass, C. y Selkoe, D. J. 1993 Cell 75, 1039-1042; Simons, M. y col. 1996 J. Neurosci. 16, 899-908). Además de los péptidos $A\beta$ dominantes que empiezan por L-Asp en el extremo N ($A\beta_{1-42/40}$), aparece una gran heterogeneidad de

formas truncadas N-terminales en placas seniles. Se ha notificado que dichos péptidos acortados son más neurotóxicos *in vitro* y que agregan más rápidamente que las isoformas completas (Pike, C. J. y col. 1995 J. Biol. Chem. 270 23895-23898). Los péptidos N-truncados son conocidos por sobreproducirse en sujetos con EA familiar de inicio temprano (EAF) (Saïdo, T. C. y col. 1995 Neuron 14, 457-466; Russo, C. y col. 2000 Nature 405, 531-532), por aparecer temprano y aumentar con la edad en cerebros con síndrome de Down (SD) (Russo, C. y col. 1997 FEBS Lett. 409, 411-416, Russo, C. y col. 2001 Neurobiol. Dis. 8, 173-180; Tekirian, T. L. y col. 1998 J. Neuropathol. Exp. Neurol. 57, 76-94). Finalmente, su cantidad refleja la gravedad progresiva de la enfermedad (Russo, C. y col. 1997 FEBS Lett. 409, 411-416). Los procesos postraduccionales adicionales pueden modificar además el extremo N mediante isomerización o racemización del aspartato en posición 1 y 7 y mediante ciclación del glutamato en los residuos 3 y 11. Las isoformas que contienen piroglutamato en posición 3 [pGlu³]A β 3-40/42) representan las formas dominantes, aproximadamente un 50% de la cantidad total de A β , de la especie N-truncada en placas seniles (Mori, H. y col. 1992 J. Biol. Chem. 267, 17082-17086, Saïdo, T. C. y col. 1995 Neuron 14, 457-466; Russo, C. y col. 1997 FEBS Lett. 409, 411-416; Tekirian, T. L. y col. 1998 J. Neuropathol. Exp. Neurol. 57, 76-94; Geddes, J. W. y col. 1999 Neurobiol. Aging 20,75-79; Harigaya, Y. y col. 2000 Biochem. Biophys. Res. Commun. 276,422-427) y están también presentes en lesiones preamiloides (Lalowski, M. y col. 1996 J. Biol. Chem. 271, 33623-33631). La acumulación de péptidos A β N3(pE) es debida probablemente a la modificación estructural que potencia la agregación y confiere resistencia a la mayoría de aminopeptidasas (Saïdo, T. C. y col. 1995 Neuron 14, 457-466; Tekirian, T. L. y col. 1999 J. Neurochem. 73, 1584-1589). Esta evidencia proporciona pistas de un papel clave de los péptidos A β N3(pE) en la patogénesis de EA. Sin embargo, se sabe relativamente poco

sobre su neurotoxicidad y propiedades de agregación (He, W. y Barrow, C. J. 1999 Biochemistry 38, 10871-10877; Tekirian, T. L. y col. 1999 J. Neurochem. 73, 1584-1589). Además, la acción de estas isoformas sobre células gliales y la respuesta glial a estos péptidos son completamente desconocidas, aunque la glía activada está estrictamente asociada a placas seniles y podría contribuir activamente a la acumulación de depósitos amiloides. En estudios recientes, se investigaron la toxicidad, propiedades de agregación y catabolismo de los péptidos A β 1-42, A β 1-40, [pGlu³]A β 3-42 y [pGlu³]A β 3-40 en cultivos de células neuronales y gliales, y se mostró que la modificación de piroglutamato exacerba las propiedades tóxicas de los péptidos A β e inhibe también su degradación por astrocitos cultivados. Shirotani y col. investigaron la generación de péptidos [pGlu³]A β en neuronas corticales primarias infectadas por el virus Sindbis *in vitro*. Construyeron ADN complementarios de proteína precursora de amiloide que codificaban un precursor potencial de [pGlu³]A β mediante sustitución y delección aminoacídicas. Para un precursor artificial que empiece con un residuo de glutamina N-terminal en lugar del glutamato en el precursor natural, se ha sugerido una conversión espontánea o una conversión enzimática por glutaminil ciclase en piroglutamato. El mecanismo de ciclación de glutamato N-terminal en posición 3 en el precursor natural de [pGlu³]A β no se ha determinado *in vivo* (Shirotani, K., Tsubuki, S., Lee, H.J. Maruyama, K. y Saido, T. C. (2002) Neurosci. Lett. 327, 25-28).

La dipeptidil peptidasa IV (DP IV) es una serinproteasa que escinde después de prolina (en menor medida después de alanina, serina o glicina) encontrada en diversos tejidos del cuerpo, incluyendo riñón, hígado e intestino, y escinde dipéptidos N-terminales de una cadena peptídica. Se ha mostrado recientemente que la DP IV desempeña un papel importante en el metabolismo neuropeptídico, la activación de linfocitos T, la unión de células cancerosas al endotelio y la entrada de VIH en

células linfoides. Véanse, por lo tanto, los documentos WO 02/34242, WO 02/34243, WO 03/002595 y WO 03/002596.

Es conocido que los inhibidores de DP IV pueden ser útiles para el tratamiento de intolerancia a la glucosa y diabetes sacarina (solicitud de patente internacional, número de publicación WO 99/61431, Pederson, R. A. y col. 1998 Diabetes 47,1253-1258 y Pauly, R. P. y col. 1999 Metabolism 48, 385-389). En particular, el documento WO 99/61431 da a conocer inhibidores de DP IV que comprenden un residuo aminoacídico y un grupo tiazolidina o pirrolidina, y sales de los mismos, especialmente L-treo-isoleuciltiazolidina, L-alo-isoleuciltiazolidina, L-treo-isoleucilpirrolidina, L-alo-isoleuciltiazolidina, L-alo-isoleucilpirrolidina y sales de las mismas.

Son ejemplos adicionales de inhibidores de dipeptidil peptidasa IV de bajo peso molecular agentes tales como derivados de tetrahidroisoquinolin-3-carboxamida, 2-cianopirroles y 2-cianopirrolidinas N-sustituídos, N-(glicil-N'-sustituído)-2-cianopirrolidinas, N-(glicil sustituido)-tiazolidinas, N-(glicil sustituido)-4-cianotiazolidinas, inhibidores de aminoacilboronoprolilo, pirrolidinas condensadas con ciclopropilo y compuestos heterocíclicos. Se describen inhibidores de dipeptidil peptidasa IV en los documentos US 6.380.398, US 6.011.155; US 6.107.317; US 6.110.949; US 6.124.305; US 6.172.081; WO 95/15309, WO 99/61431, WO 99/67278, WO 99/67279, DE 19.834.591, WO 97/40832, DE 19.616.486 C2, WO 98/19998, WO 00/07617, WO 99/38501, WO 99/46272, WO 99/38501, WO 01/68603, WO 01/40180, WO 01/81337, WO 01/81304, WO 01/55105, WO 02/02560 y WO 02/14271, WO 02/04610, WO 02/051836, WO 02/068420, WO 02/076450; WO 02/083128, WO 02/38541, WO 03/000180, WO 03/000181, WO 03/000250, WO 03/002530, WO 03/002531, WO 03/002553, WO 03/002593, WO 03/004496, WO 03/024942 y WO 03/024965.

35 **Resumen de la invención**

La presente invención proporciona sustratos fisiológicos novedosos de QC en mamíferos, Aβ3-40/42,

[Gln³]Aβ3-40/42, [Glu¹¹]Aβ11-40/42, [Gln¹¹]Aβ11-40/42, [Gln¹]gastrina, [Gln¹]neurotensina, [Gln¹]FPP, [Gln¹]CCL 2, [Gln¹]CCL 7, [Gln¹]CCL 8, [Gln¹]CCL 16, [Gln¹]CCL 18, [Gln¹]fractalcina, [Gln¹]orexina A, [Gln³]glucagón3-29 y
5 [Gln⁵]sustancia P5-11 y el uso de inhibidores de QC y composiciones farmacéuticas que comprenden inhibidores de QC para el tratamiento de afecciones que pueden tratarse mediante la modulación de la actividad de QC.

Se ha demostrado en estudios de inhibición que la QC
10 humana es una transferasa dependiente de metal. La apoenzima QC ha podido reactivarse muy eficazmente con iones cinc, y el motivo de unión a metal de las aminopeptidasas dependientes de cinc está también presente en QC humana. Los compuestos que interaccionan con el metal
15 unido a sitio activo son potentes inhibidores.

Inesperadamente, se ha mostrado que la QC humana recombinante, así como la actividad de QC de extractos cerebrales, catalizan tanto el glutaminilo N-terminal como la ciclación de glutamato. Lo más notable es el hallazgo de
20 que la conversión de Glu¹ catalizada por ciclase está favorecida a aproximadamente pH 6,0, mientras que la conversión de Gln¹ en derivados de pGlu ocurre a un pH óptimo de aproximadamente 8,0. Puesto que la formación de péptidos relacionados con pGlu-Aβ puede suprimirse mediante
25 la inhibición de la QC humana recombinante y la actividad de QC de extractos de pituitaria porcina, la enzima QC es una diana en el desarrollo de fármacos para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

Al administrar inhibidores de la actividad de QC a un
30 mamífero, puede ser posible evitar o aliviar o tratar afecciones seleccionadas de enfermedad de Alzheimer y síndrome de Down.

Además, mediante la administración de inhibidores de la actividad de QC a un mamífero, puede ser posible
35 suprimir la proliferación de células progenitoras mieloides.

Además, la administración de inhibidores de QC puede

conducir a la supresión de la fertilidad masculina.

En una realización preferida, la presente invención proporciona el uso de inhibidores de la actividad de QC en combinación con inhibidores de DP IV o enzimas tipo DP IV para el tratamiento o alivio de afecciones que pueden tratarse mediante la modulación de la actividad de QC y/o DP IV.

La presente invención proporciona composiciones farmacéuticas para administración parenteral, entérica u oral, que comprenden al menos un inhibidor de QC opcionalmente en combinación con vehículos y/o excipientes acostumbrados; o comprende al menos un inhibidor de QC en combinación con al menos un inhibidor de DP IV, opcionalmente en combinación con vehículos y/o excipientes acostumbrados.

Breve descripción de los dibujos

Se tendrá una comprensión adicional de estos y otros aspectos de la presente invención por referencia a las figuras, en las que:

La **Figura 1** muestra las curvas de progresión de la ciclación de H-Gln-Ala-OH, catalizada por QC humana, controlando la reducción de la absorbancia a 340 nm. Las muestras contenían NADH/H⁺ 0,3 mM, ácido α -cetoglutarico 14 mM, glutamato deshidrogenasa 30 U/ml y H-Gln-Ala-OH 1 mM. En las curvas A-D, se aplicaron concentraciones variables de QC: A, 10 mU/ml, B, 5 mU/ml, C, 2,5 mU/ml. En el caso de la curva D, se omitió la QC. Se obtuvo una relación lineal entre la concentración de QC y la actividad observada (inserto).

La **Figura 2** muestra la dependencia del pH de la QC humana y de papaya (inserto), determinada en condiciones de reacción de primer orden usando Glu- β NA como sustrato. En el caso de QC humana, se usó un sistema tampón que proporcionaba una fuerza iónica constante según Ellis y Morrison, constituido por MES 25 mM, ácido acético 25 mM y Tris 50 mM (Ellis, K. J. y Morrison, J. F. 1982 Methods Enzymol. 87, 405-426). Debido a un efecto ligeramente

inhibidor de Tris, se investigó la QC de papaya usando un tampón Mops 50 mM. Se ajustó la fuerza iónica a 0,05 M mediante la adición de NaCl. Se evaluaron los perfiles de velocidad ajustándose a un modelo que está basado en los grupos de disociación. En el caso de la QC de papaya, se obtuvo un pKa de $7,13 \pm 0,03$ ajustando los datos a un modelo de disociación simple.

La **Figura 3** muestra el efecto del pH sobre la estabilidad de la QC de látex de papaya y QC humana. Se diluyó 20 veces una disolución madre enzimática en tampón 0,1 M de diversos valores de pH (pH 4-7 citrato de sodio, pH 7-10 fosfato de sodio). Se incubaron las disoluciones enzimáticas a 30°C durante 30 min y posteriormente se analizó la actividad enzimática según el protocolo estándar.

La **Figura 4** muestra la comparación de la constante de especificidad k_{cat}/K_M para un conjunto de sustratos que contienen glutamato en la segunda posición aminoacídica. Aunque se detectó un aumento de especificidad de la QC humana de los di- a los tetrapéptidos, no se observó cambio en el caso de QC de papaya. Los datos aquí presentados son una representación de los parámetros dados en la Tabla 3.

La **Figura 5** muestra la formación de pGlu-Lys(pGlu)-Arg-Leu-Ala-NH₂ a partir de H-Gln-Lys(Gln)-Arg-Leu-Ala-NH₂, catalizada por QC humana. La conversión de sustrato se controla mediante el cambio dependiente del tiempo de la relación m/z debido a la expulsión de amoníaco. La composición de la muestra era sustrato 0,5 mM, QC 38 nM en Tris/HCl 40 mM, pH 7,7. En los momentos indicados, se retiraron muestras del tubo de ensayo, se mezclaron con disolución de matriz (1:1 v/v) y se registraron posteriormente los espectros de masas. Se observó una dependencia muy similar en el caso de QC de papaya.

La **Figura 6** muestra la formación pGlu-Phe-Lys-Ala-Glu-NH₂ a partir de H-Gln(NMe)-Phe-Lys-Ala-Glu-NH₂ catalizada por QC de papaya. Se controla la conversión de sustrato mediante el cambio dependiente del tiempo de la relación de

m/z debido a la expulsión de metilamina. La composición de la muestra era sustrato 0,5 mM, QC de papaya 0,65 μ M en Tris/HCl 40 mM, pH 7,7. En los momentos indicados, se retiraron muestras del tubo de ensayo, se mezclaron con disolución de matriz (1:1 v/v) y posteriormente se registraron los espectros de masas. No se observó conversión de sustrato en muestras sin QC de papaya o aplicando QC humana hasta 1,5 μ M al sustrato (no mostrado).

La **Figura 7** muestra la formación de [Gln³]A β 3-11 a partir de [Gln³]A β 1-11 catalizada por DP IV. En los tiempos indicados, se retiraron muestras del tubo de ensayo, se mezclaron con disolución de matriz (1:1 v/v) y posteriormente se registraron los espectros de masas.

La **Figura 8** muestra la prevención de la escisión de [Gln³]A β 1-11 por el inhibidor de DP IV Val-pirrolidida (Val-Pyrr). En los tiempos indicados, se retiraron muestras del tubo de ensayo, se mezclaron con disolución de matriz (1:1 v/v) y posteriormente se registraron los espectros de masas.

La **Figura 9** muestra la formación de [pGlu³]A β 3-11 a partir de [Gln³]A β 3-11 catalizada por QC. En los tiempos indicados, se retiraron muestras del tubo de ensayo, se mezclaron con disolución de matriz (1:1 v/v) y posteriormente se registraron los espectros de masas.

La **Figura 10** muestra la inhibición de la formación de [pGlu³]A β 3-11 a partir de [Gln³]A β 3-11 mediante el inhibidor de QC 1,10-fenantrolina. En los tiempos indicados, se retiraron muestras del tubo de ensayo, se mezclaron con disolución de matriz (1:1 v/v) y posteriormente se registraron los espectros de masas.

La **Figura 11** muestra la formación de [pGlu³]A β 3-11 a partir de [Gln³]A β 1-11 después de catálisis consecutiva con DP IV y QC. En los tiempos indicados, se retiraron muestras del tubo de ensayo, se mezclaron con disolución de matriz (1:1 v/v) y posteriormente se registraron los espectros de masas.

La **Figura 12** muestra la inhibición de la formación de

[pGlu³]Aβ3-11 a partir de [Gln³]Aβ1-11 por el inhibidor de QC 1,10-fenantrolina en presencia de DP IV y QC catalíticamente activas. En los tiempos indicados, se retiraron muestras del tubo de ensayo, se mezclaron con la disolución de matriz (1:1 v/v) y posteriormente se registraron los espectros de masas.

La **Figura 13** muestra la reducción de la formación de [pGlu³]Aβ3-11 a partir de [Gln³]Aβ1-11 por el inhibidor de DP IV Val-Pyrr en presencia de DP IV y QC catalíticamente activas. En los tiempos indicados, se retiraron muestras de la mezcla de ensayo, se mezclaron con la disolución de matriz (1:1 v/v) y posteriormente se registraron los espectros de masas.

La **Figura 14** muestra la formación de [pGlu³]Aβ-péptido3-11 a partir de [Gln³]Aβ1-11 después de catálisis consecutiva por aminopeptidasa(s) y QC que están presentes en homogeneizado de pituitaria porcina. En los tiempos indicados, se retiraron muestras del tubo de ensayo, se mezclaron con la disolución de matriz (1:1 v/v) y posteriormente se registraron los espectros de masas.

Las **Figuras 15 A y B** muestran los espectros de masas de Aβ3-11a y Aβ3-21a incubados con QC humana recombinante, que se hirvió durante 10 minutos antes del uso. **C y D** muestran los espectros de masas de Aβ3-11 y Aβ3-21a en presencia de QC humana activa, que dan como resultado la formación de [pGlu³]Aβ3-11a y [pGlu³]Aβ3-21a, respectivamente. **E y F** muestran los espectros de masas de Aβ3-11a y Aβ3-21a en presencia de QC activa y bencimidazol 5 mM que suprime la formación de [pGlu³].

La **Figura 16** muestra las velocidades de reacción de la conversión de Glu-βNA catalizada por QC de papaya representadas frente a la concentración de sustrato. Se midieron las velocidades iniciales en tampón pirofosfato 0,1 M, pH 6,1 (cuadrados), tampón fosfato 0,1 M, pH 7,5 (círculos) y tampón borato 0,1 M, pH 8,5 (triángulos). Los parámetros cinéticos eran los siguientes: $K_M = 1,13 \pm 0,07$ mM, $k_{cat} = 1,13 \pm 0,04 \text{ min}^{-1}$ (pH 6,1); $K_M = 1,45 \pm 0,03$ mM,

$k_{\text{cat}} = 0,92 \pm 0,01 \text{ min}^{-1}$ (pH 7,5); $K_M = 1,76 \pm 0,06 \text{ mM}$, $k_{\text{cat}} = 0,56 \pm 0,01 \text{ min}^{-1}$ (pH 8,5).

La **Figura 17** muestra la dependencia del pH de la conversión de Gln- β NA (círculos) y Glu- β NA (cuadrados),
5 determinada en condiciones de ley de reacción de primer orden ($S \ll K_M$). La concentración de sustrato era 0,01 mM y 0,25 mM, respectivamente. Para ambas determinaciones, se aplicó un sistema tampón de tres componentes constituido por ácido acético 0,05 M, ácido pirofosfórico 0,05 M y
10 tricina 0,05 M. Se ajustaron todos los tampones a igual conductividad mediante la adición de NaCl, para evitar diferencias en la fuerza iónica. Se ajustaron los datos a ecuaciones que dieran cuenta de los dos grupos de disociación, revelando valores de pKa de $6,91 \pm 0,02$ y $9,5$
15 $\pm 0,1$ para Gln- β NA y de $4,6 \pm 0,1$ y $7,55 \pm 0,02$ para Glu- β NA. Los valores de pKa de los respectivos grupos amino del sustrato, determinados por valoración, eran de $6,97 \pm 0,01$ (Gln- β NA) y $7,57 \pm 0,05$ (Glu- β NA). Se llevaron a cabo todas las determinaciones a 30°C.

La **Figura 18** muestra las curvas de progresión de la ciclación de H-Gln-AMC catalizada por QC humana en presencia de imidazol, ácido dipicolínico y en ausencia de un compuesto inhibidor. La forma hiperbólica de la curva en presencia de ácido dipicolínico indica que el ión metálico
25 se retira del sitio activo de QC.

La **Figura 19** muestra la inactivación dependiente del tiempo de QC por el quelante heterocíclico 1,10-fenantrolina. Después de la incubación de la enzima QC con el inhibidor en ausencia de sustrato (línea continua), se
30 observó una actividad enzimática reducida en comparación con muestras que no se preincubaron con inhibidor (línea de puntos), indicando que el ión metálico se retira del sitio activo de QC.

La **Figura 20** muestra la reactivación de QC humana con iones metálicos monovalentes y divalentes. La QC se
35 inactivó mediante la adición de ácido dipicolínico 2 mM en Bis-Tris 50 mM, pH 6,8. Posteriormente, se sometió la

enzima a diálisis frente a Bis-Tris 50 mM, pH 6,8, que contenía EDTA 1,0 mM. Se consiguió la reactivación de las enzimas mediante la incubación de la muestra de enzima inactiva con iones metálicos a una concentración de 0,5 mM, en presencia de EDTA 0,5 mM para evitar una reactivación inespecífica por trazas de iones metálicos presentes en las disoluciones de tampón. Se dan los controles por muestras enzimáticas que no se inactivaron, sino que se dializaron también frente a disolución de EDTA como la enzima inactivada (+EDTA) y muestras de enzima que se dializaron frente a disolución tampón sin EDTA añadido (-EDTA).

Figura 21. Alineamiento de secuencia de QC humana (hQC) y otros miembros de la familia de M28 de la metalopeptidasa Clan MH. Se efectuó un alineamiento de secuencia múltiple usando ClustalW de ch.EMBnet.org con los parámetros por defecto. Se muestra la conservación de los residuos de ligamiento al ión cinc para QC humana (hQC; GenBank X71125), la aminopeptidasa dependiente de Zn de *Streptomyces griseus* (SGAP; Swiss-Prot P80561) y en el dominio de dipeptidasa ácida N-acetilada-alfa-ligada (NAALADasa f) (residuos 274-587) de la glutamato carboxipeptidasa humana II (hGCP II; Swiss-Prot Q04609). Los aminoácidos implicados en la unión a metal se imprimen en negrita y subrayado. En el caso de QC humana, estos residuos son las presuntas contrapartidas de las peptidasas.

Secuencias de péptidos

Los péptidos mencionados y usados en la presente memoria tienen las siguientes secuencias:

30 AB1-42:

Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val-Ile-Ala

Aβ1-40:

35 Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val

Aβ3-42:

Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-Val-His-His-Gln-Lys-
 Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-
 Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val-Ile-Ala

5 **Aβ3-40:**

Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-Val-His-His-Gln-Lys-
 Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-
 Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val

Aβ1-11a:

10 Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-NH₂

Aβ3-11a:

Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-NH₂

Aβ1-21a:

Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-Val-His-His-
 15 Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-NH₂

Aβ3-21a:

Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-Val-His-His-Gln-Lys-
 Leu-Val-Phe-Phe-Ala-NH₂

Gln³-Aβ3-40:

20 Gln-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-Val-His-His-Gln-Lys-
 Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-
 Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val

Gln³-Aβ3-21a:

Gln-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-Val-His-His-Gln-Lys-
 25 Leu-Val-Phe-Phe-Ala-NH₂

Gln³-Aβ1-11a:

Asp-Ala-Gln-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-NH₂

Gln³-Aβ3-11a:

Gln-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-NH₂

30 **Descripción detallada de la invención**

La presente invención proporciona inhibidores de
 glutaminil ciclasa (QC) para

a) el tratamiento de enfermedades en mamíferos que
 pueden tratarse mediante la modulación de la actividad QC
 35 *in vivo* y/o

b) la modulación de procesos fisiológicos basados en
 la acción de péptidos que contienen pGlu causada por la

modulación de la actividad de QC.

Además, la presente invención proporciona compuestos para la inhibición de glutaminil ciclasa (QC, EC 2.3.2.5) y/o enzimas tipo QC en un mamífero y el uso de inhibidores de QC para el tratamiento de afecciones patológicas relacionadas con la actividad de QC.

La presente solicitud se refiere también a un nuevo procedimiento para el tratamiento de enfermedad de Alzheimer y síndrome de Down. Los extremos N de los péptidos β -amiloides depositados en el cerebro en enfermedad de Alzheimer y síndrome de Down portan ácido piroglutámico. La formación de pGlu es un evento importante en el desarrollo y la progresión de la enfermedad, puesto que los péptidos β -amiloides modificados muestran una tendencia potenciada a agregación β -amiloide y toxicidad, empeorando probablemente el inicio y progresión de la enfermedad. (Russo, C. y col. 2002 J. Neurochem. 82, 1480-1489).

En contraposición, en los péptidos A β naturales (3-40/42), el ácido glutámico está presente como aminoácido N-terminal. No hay conversión enzimática de Glu en pGlu conocida hasta la fecha. Además, no se ha observado todavía la ciclación espontánea de péptidos de Glu en péptidos de pGlu. Por lo tanto, era un aspecto de la presente invención determinar el papel de QC en enfermedad de Alzheimer y el síndrome de Down. Se dirigió a este aspecto mediante la síntesis de A β 3-11 y A β 1-11 que contenían el aminoácido glutamina en lugar de ácido glutámico en posición 3, la determinación de las características de sustrato de estos péptidos β -amiloides modificados frente a QC, DP IV y enzimas tipo DP IV y aminopeptidasas y el uso de inhibidores de QC para evitar la formación de pGlu a partir de un residuo glutaminilo N-terminal de los péptidos 1-11 y 3-11 derivados de β -amiloide. Se muestran los resultados en el ejemplo 8. Se describe el procedimiento aplicado en el ejemplo 3.

Hasta la fecha, no hay pruebas que indiquen una

implicación de QC en la progresión de la enfermedad, porque el ácido glutámico es el aminoácido N-terminal en A β (3-40/42 o 11-40/42). Pero la QC es la única enzima conocida capaz de formar pGlu en el extremo N de péptidos. Otros
5 aspectos de la presente invención conciernen a los siguientes hallazgos y descubrimientos:

a) en una reacción secundaria, la QC cataliza la ciclación de ácido glutámico a ácido piroglutámico a velocidades muy bajas,

10 b) el ácido glutámico de APP, o sus péptidos β -amiloides formados posteriormente, se convierten en glutamina postraduccionalmente mediante una actividad enzimática desconocida y, en una segunda etapa, la QC cataliza la ciclación de glutamina a ácido piroglutámico
15 después de procesar el extremo N del péptido β -amiloide,

c) el ácido glutámico se convierte en glutamina postraduccionalmente mediante catálisis química o autocatálisis y, posteriormente, la QC cataliza la ciclación de glutamina a ácido piroglutámico después de
20 procesar el extremo N del péptido β -amiloide,

d) hay mutaciones en el gen APP que codifica la proteína β -amiloide que conducen a Gln en lugar de Glu en posición 3. Después de la traducción y procesamiento del extremo N, la QC cataliza la ciclación de glutamina a ácido
25 piroglutámico,

e) se incorpora glutamina a la cadena peptídica naciente de APP debido a una disfunción de una actividad enzimática desconocida y, posteriormente, la QC cataliza la ciclación de glutamina N-terminal a ácido piroglutámico
30 después de procesar el extremo N del péptido β -amiloide.

La QC está implicada en la etapa crítica de los cinco casos enumerados anteriormente, a saber, la formación de ácido piroglutámico que favorece la agregación de péptidos β -amiloides. Por tanto, la inhibición de QC conduce a la
35 prevención de la precipitación de A β 3-40/41/43 o A β 11-40/41-43 que forman placa, causando el inicio y la progresión de enfermedad de Alzheimer y síndrome de Down,

independientemente del mecanismo por el que ocurra la ciclación.

El glutamato se encuentra en las posiciones 3, 11 y 22 del péptido β -amiloide. Entre ellas, la mutación de ácido glutámico (E) a glutamina (Q) en posición 22 (correspondiente a la proteína precursora amiloide APP 693, Swissprot P05067) se ha descrito como la mutación de amiloidosis cerebroarterial de tipo holandés.

Se ha descrito que los péptidos β -amiloides con un residuo de ácido piroglutámico en posición 3, 11 y/o 22 son más citotóxicos e hidrófobos que A β 1-40/42/43 (Saïdo T. C. 2000 Medical Hypotheses 54 (3): 427-429).

Pueden generarse múltiples variaciones N-terminales por la enzima β -secretasa, enzima de escisión de proteína precursora amiloide en el sitio β (BACE) en diferentes sitios (Huse J. T. y col. 2002 J. Biol. Chem. 277 (18): 16278-16284), y/o mediante procesamiento con aminopeptidasa. En todos los casos, puede tener lugar la ciclación según a) a e) como se describe anteriormente.

Hasta ahora, no había evidencia experimental que apoyara la conversión enzimática de péptidos Glu¹ en péptidos pGlu por una glutamil ciclasa desconocida (EC) correspondiente a la ruta a) (Garden, R. W., Moroz, T. P., Gleeson, J. M., Floyd, P. D., Li, L. J., Rubakhin, S. S. y Sweedler, J. V. (1999) J. Neurochem. 72, 676-681; Hosoda R. y col. (1998) J. Neuropathol. Exp. Neurol. 57, 1089-1095). Hasta la fecha, no se ha identificado dicha actividad enzimática capaz de ciclar péptidos Glu¹ que están protonados N-terminalmente y poseen un resto γ -carboxilato Glu¹ cargado negativamente en condiciones de pH débilmente alcalinas.

La actividad de QC frente a sustratos de Gln¹ se reduce drásticamente por debajo de pH 7,0. En contraposición, parece que la conversión de Glu¹ puede ocurrir en condiciones de reacción ácidas (Iwatsubo, T., Saïdo, T. C., Mann, D. M., Lee, V. M. y Trojanowski, J. Q. (1996) Am. J. Pathol. 149, 1823-1830; Russo, C., Saïdo, T.

C., DeBusk, L. M., Tabaton, M., Gambetti, P. y Teller, J. K. (1977) FEBS Lett. 409, 411-416; Russo, C., Salis, S., Dolcini, V., Venezia, V., Song, X. H., Teller, J. K. y Schettini, G. (2001) Neurobiol. Dis. 8, 173-180; Tekirian, T. L., Saido, T. C., Markesbery, W. R., Russell, M. J., Wekstein, D. R., Patel, E. y Geddes, J. W. (1998) J. Neuropathol. Exp. Neurol. 57, 76-94; Russo, C., Violai, E., Salis, S., Venezia, V., Dolcini, V., Damonte, G., Benatti, U., D'Arrigo, C., Patrone, E., Carlo, P. y Schettini, G. (2002) J. Neurochem. 82, 1480-1489; Hosoda, R., Saido, T. C., Otvos, L., Jr., Arai, T., Mann, D. M., Lee, V. M., Trojanowski, J. Q. e Iwatsubo, T. (1998) J. Neuropathol. Exp. Neurol. 57, 1089- 1095; Garden, R. W., Moroz, T. P., Gleeson, J. M., Floyd, P. D., Li, L. J., Rubakhin, S. S. y Sweedler, J. V. (1999) J. Neurochem. 72, 676-681).

Según la presente invención, se investigó si la QC es capaz de reconocer y recombinar péptidos derivados de β -amiloide en condiciones débilmente ácidas. Por lo tanto, se sintetizaron e investigaron los péptidos [Gln³]A β 1-11a, A β 3-11a, [Gln³]A β 3-11a, A β 3-21a, [Gln³]A β 3- 21a y [Gln³]A β 3-40 como sustratos potenciales de la enzima. Se eligieron estas secuencias por imitar los péptidos [Glu³]A β y [Gln³]A β naturales truncados N-terminal y C-terminalmente que podrían aparecer debido a amidación de Glu postraducciona.

En la presente invención, se ha mostrado que la QC de papaya y humana catalizan la ciclación tanto de glutaminilo como de glutamilo. Aparentemente, la función fisiológica primaria de QC es terminar la maduración hormonal en células endocrinas mediante ciclación de glutamina antes o durante el proceso de secreción hormonal. Dichas vesículas secretoras son conocidas por ser de pH ácido. Por tanto, una actividad secundaria de la enzima en el estrecho intervalo de pH de 5,0 a 7,0 podría ser su recientemente descubierta actividad glutamil ciclasa que transforma también péptidos Glu-A β . Sin embargo, debido a la aparición mucho más lenta de la ciclación de Glu comparada con la

conversión de Gln, es cuestionable si la ciclación de glutamilo desempeña un papel fisiológico significativo. En la patología de trastornos neurodegenerativos, sin embargo, la ciclación de glutamilo es relevante.

5 Investigando la dependencia del pH de esta reacción enzimática, se encontró que el extremo N no protonado era esencial para la ciclación de péptidos Gln¹ y, en consecuencia, que el valor de pKa del sustrato era idéntico al valor de pKa para catálisis de QC (véase la Figura 17).
10 Por tanto, la QC estabiliza el ataque nucleófilo intramolecular del resto α -amino no protonado al carbono de γ -carbonilo activado electrófilamente por amidación (esquema 1).

En contraposición con la carga monovalente presente en
15 péptidos que contienen glutamina N-terminal, el residuo de Glu N-terminal en péptidos que contienen Glu está predominantemente cargado divalentemente a pH aproximadamente neutro. El glutamato exhibe valores de pKa de aproximadamente 4,2 y 7,5 para el resto γ -carboxílico y
20 α -amino, respectivamente. Concretamente, a pH neutro y superior, aunque el nitrógeno de α -amino está no protonado en parte o totalmente, el grupo γ -carboxílico nucleófilo está no protonado, no ejerciendo así actividad de carbonilo electrófilo. Por tanto, es imposible la ciclación
25 intramolecular.

Sin embargo, en el intervalo de pH de aproximadamente 5,2-6,5, entre sus valores de pKa respectivos, los dos grupos funcionales están presentes ambos en formas no ionizadas, a concentraciones de aproximadamente 1-10% (-NH_2) o 10-1% (-COOH) del péptido que contiene Glu N-terminal total. Como resultado, en un intervalo de pH débilmente ácido, están presentes especies de péptidos con Glu N-terminal que portan ambos grupos no cargados y, por lo tanto, es posible que la QC pudiera estabilizar el
30 intermedio de ciclación intramolecular a péptido pGlu. Concretamente, si el grupo γ -carboxílico está protonado, el carbono de carbonilo es suficientemente electrófilo para

permitir el ataque nucleófilo por el grupo α -amino no protonado. A este pH, el ión hidroxilo funciona como grupo saliente (esquema 3). Estas suposiciones se corroboran por los datos de dependencia del pH obtenidos para la conversión de Glu- β NA catalizada por QC (véase el ejemplo 11). En contraposición con la conversión de glutamina de Gln- β NA por QC, el pH óptimo de la catálisis se desplaza al intervalo ácido alrededor de pH 6,0, concretamente, el intervalo de pH en el que las especies moleculares de sustrato son simultáneamente abundantes y portan un grupo γ -carboxilo protonado y α -amino no protonado. Además, el valor de pKa determinado cinéticamente de $7,55 \pm 0,02$ está en excelente acuerdo con el del grupo α -amino de Glu- β NA, determinado por valoración ($7,57 \pm 0,05$).

Fisiológicamente, a pH 6,0 la constante de velocidad de segundo orden (o constante de especificidad, k_{cat}/K_M) de la ciclación de glutamato catalizada por QC podría estar en el intervalo de 8.000 veces más lenta que la de ciclación de glutamina (Figura 17). Sin embargo, el recambio no enzimático de ambos sustratos modelo Glu- β NA y Gln- β NA es despreciable, estando conforme con la formación de péptido pGlu despreciable observada en la presente invención. Por tanto, para la formación de pGlu por QC, puede estimarse una aceleración de al menos 10^8 a partir de la relación de constantes de velocidad enzimática frente a no enzimática (comparando las constantes de velocidad de segundo orden para la catálisis enzimática con las respectivas constantes de velocidad de primer orden de ciclación no enzimática, el factor de aprovechamiento catalítico es de 10^9 - 10^{10} M^{-1} para la conversión de Gln y Glu, respectivamente). La conclusión a partir de estos datos es que, *in vivo*, sólo parece concebible una ruta enzimática resultante en la formación de pGlu.

Puesto que la QC es muy abundante en el cerebro, y teniendo en cuenta la alta tasa de recambio de $0,9 \text{ min}^{-1}$ encontrada recientemente para la maduración de $30 \text{ }\mu\text{M}$ de péptido similar a (Gln-)TRH (Prokai, L., Prokai-Tatrai, K.,

Ouyang, X., Kim, H. S., Wu, W. M., Zharikova, A. y Bodor, N. (1999) J. Med. Chem. 42, 4563-4571), puede predecirse una semivida de ciclación de aproximadamente 100 horas para un sustrato de glutamato apropiado, proporcionadas
5 condiciones de reacciones similares. Además, dada la compartimentalización y localización de la QC/EC cerebral en la ruta secretora, las concentraciones de enzima y sustrato y las condiciones de reacción *in vivo* reales podrían ser aún más favorables para la ciclación enzimática
10 en la célula intacta. Y si se transforma la Glu N-terminal en Gln, podría esperarse una formación de pGlu mediada por QC mucho más rápida. *In vitro*, se suprimían ambas reacciones aplicando inhibidores de la actividad de QC/EC (Figuras 9, 10 y 15).

15 En resumen, la presente invención muestra que la QC humana, que es muy abundante en el cerebro, es un probable catalizador de la formación de péptidos pGlu-A β amiloidogénicos a partir de precursores Glu-A β y Gln-A β , que constituyen más del 50% de los depósitos de placa
20 encontrados en enfermedad de Alzheimer. Estos hallazgos identifican a QC/EC como un actor en la formación de placa senil y por tanto como una novedosa diana de fármacos en el tratamiento de enfermedad de Alzheimer.

En una segunda realización de la presente invención,
25 se encontró que los péptidos derivados de β -amiloide son un sustrato de dipeptidil peptidasa IV (DP IV) o enzimas tipo DP IV, preferiblemente dipeptidil peptidasa II (DP II). DP IV, DP II u otras enzimas tipo DP IV liberan un dipéptido del extremo N del péptido β -amiloide modificado (1-11),
30 generando el péptido β -amiloide (3-11) con glutamina como residuo aminoacídico N-terminal. Se muestran los resultados en el ejemplo 8.

Antes de la escisión por DP II, DP IV u otras enzimas tipo DP IV, el enlace peptídico entre ácido aspártico
35 (residuo 1 del péptido β -amiloide) y alanina (residuo 2 del péptido β -amiloide) puede isomerizarse, proporcionando un residuo de isoaspartilo como se describe en la bibliografía

(Kuo, Y.-M., Emmerling, M. R., Woods, A. S., Cotter, R. J., Roher, A. E. (1997) BBRC 237, 188-191; Shimizu, T., Watanabe, A., Ogawara, M., Mori, H. y Shirasawa, T. (2000) Arch. Biochem. Biophys. 381, 225-234).

5 Estos residuos de isoaspartilo vuelven al péptido β -amiloiide resistente a la degradación por aminopeptidasa y, en consecuencia, las placas centrales contienen altas cantidades de péptidos isoAsp¹- β -amiloides, lo que sugiere un recambio reducido en el extremo N.

10 Sin embargo, en la presente invención se demuestra por primera vez que el dipéptido N-terminal H-isoAsp¹-Ala²-OH puede liberarse por dipeptidil peptidasas, especialmente en condiciones ácidas. Además, se ha mostrado que la isomerización puede preceder también la escisión por β -secretasa, y que la isomerización puede acelerar el
15 procesamiento proteolítico, conduciendo por tanto a la liberación de un enlace isoaspartilo n-terminal de péptidos isoAsp¹- β -amiloides, que posteriormente se somete a recambio por DP II, DP IV o enzimas tipo DP IV (Momand, J. y Clarke, S. (1987) Biochemistry 26, 7798- 7805; Kuo, Y.-M., Emmerling, M. R., Woods, A. S., Cotter, R. J., Roher, A. E. (1997) BBRC 237, 188-191). En consecuencia, la inhibición de la formación de isoaspartilo puede conducir a la reducción de la escisión por β -secretasa y, a su vez, a
20 una formación reducida de péptidos β -amiloides. Además, el bloqueo del recambio de péptido isoAsp¹- β -amiloiide por inhibición de DP II, DP IV o enzimas tipo DP IV evitaría la exposición de [Glu³]A β a la formación de [pGlu³]A β catalizada por QC/EC.
25 En una tercera realización de la presente invención,

30 puede usarse una combinación de inhibidores de la actividad de DP IV e inhibidores de la actividad de QC para el tratamiento de enfermedad de Alzheimer y síndrome de Down.

Se ilustra el efecto combinado de DP IV y/o enzimas
35 tipo DP IV y de QC como sigue:

a) DP IV y/o enzimas tipo DP IV escinden A β 1-40/42, liberando un dipéptido que comprende H-Asp-Ala-OH y A β 3-

40/42,

b) en una reacción secundaria, la QC cataliza la ciclación de ácido glutámico a ácido piroglutámico a velocidades muy bajas,

5 c) se convierte el ácido glutámico en glutamina en el extremo N postraduccionalmente mediante una actividad enzimática desconocida y, posteriormente, la QC cataliza la ciclación de glutamina a ácido piroglutámico después de procesar el extremo N del péptido β -amiloide,

10 d) se convierte el ácido glutámico en glutamina postraduccionalmente mediante catálisis química o autocatálisis y, en una segunda etapa, la QC cataliza la ciclación de glutamina a ácido piroglutámico después de procesar el extremo N del péptido β -amiloide,

15 e) hay mutaciones en el gen APP que codifica la proteína β -amiloide, que conducen a Gln en lugar de Glu en posición 3 de A β . Después de la traducción y el procesamiento del extremo N, la QC cataliza la ciclación de glutamina a ácido piroglutámico,

20 f) se incorpora glutamina a la cadena peptídica naciente de APP debido a una disfunción de una actividad enzimática desconocida y, posteriormente, la QC cataliza la ciclación de glutamina N-terminal a ácido piroglutámico después de procesar el extremo N del péptido β -amiloide.

25 La exposición de Gln N-terminal a la actividad de QC puede desencadenarse también por diferentes actividades peptidasas. Las aminopeptidasas pueden retirar secuencialmente Asp y Ala del extremo N de A β 1-40/41/43, descubriendo así el tercer aminoácido que tiende a
30 ciclación. Las dipeptidil peptidasas, tales como DP I, DP II, DP IV, DP 8, DP 9 y DP 10, retiran el dipéptido Asp-Ala en una etapa. Por tanto, la inhibición de la actividad aminopeptidasa o dipeptidil peptidasa es útil para evitar la formación de A β 3-40/41/43.

35 Se ilustra el efecto combinado de inhibidores de DP IV y/o enzimas tipo DP IV y de inhibidores reductores de la actividad de QC del siguiente modo:

a) Los inhibidores de DP IV y/o enzimas tipo DP IV inhiben la conversión de A β 1-40/42 en A β 3-40/42.

b) Se evita así una exposición N-terminal de ácido glutámico y no es posible la conversión en glutamina, por
5 catálisis enzimática ni química, conduciendo posteriormente a la formación de ácido piroglutámico.

c) Los inhibidores de QC evitan además la formación de ácido piroglutámico a partir de cualquier molécula de A β 3-40/42 modificada residual y de aquellas moléculas de A β 3-
10 40/42 modificadas que se generan por mutaciones del gen APP.

En la presente invención, se ha demostrado una acción combinada similar de DP IV o enzimas tipo DP IV y QC para otras hormonas peptídicas tales como glucagón, quimiocinas
15 CC y sustancia P.

El glucagón es un polipéptido de 29 aminoácidos liberado de células alfa de islote pancreático que actúa manteniendo la euglucemia mediante estimulación de la glucogenólisis y gluconeogénesis hepática. A pesar de su
20 importancia, sigue habiendo controversia sobre los mecanismos responsables del aclaramiento de glucagón en el cuerpo. Pospisilik y col. evaluaron el metabolismo enzimático del glucagón usando técnicas de espectrometría de masas sensibles para identificar los productos
25 moleculares. La incubación de glucagón con dipeptidil peptidasa IV (DP IV) porcina purificada proporcionó la producción secuencial de glucagón3-29 y glucagón5-29. En suero humano, la degradación a glucagón3-29 fue seguida rápidamente por ciclación N-terminal de glucagón, evitando
30 una hidrólisis mediada por DP IV adicional. El bioensayo de glucagón, después de incubación con DP IV purificada o suero de rata normal, demostró una pérdida significativa de actividad hiperglucémica, mientras que una incubación similar en suero de rata deficiente en DP IV no mostró
35 ninguna pérdida de bioactividad de glucagón. Se bloqueó la degradación, controlada por espectrometría de masas y bioensayo, mediante el inhibidor específico de DP IV

isoleuciltiazolidina. Estos resultados identifican a DP IV como la enzima principal implicada en la degradación e inactivación de glucagón. Estos hallazgos tienen importantes implicaciones para la determinación de los niveles de glucagón en plasma humano (Pospisilik y col., Regul. Pept. 12 de enero de 2001; 96 (3): 133-41).

La proteína quimotáctica monocítica humana (MCP)-2 se ha aislado originalmente de células de osteosarcoma estimuladas en forma de quimiocina coproducida con MCP-1 y MCP-3. Von Coillie y col. (Van Collie, E. y col. 1998 Biochemistry 37, 12672-12680) clonaron ADNc de MCP-2 extendido en el extremo 5' de una colección de ADNc de testículo humano. Codificaba una proteína MCP-2 de 76 residuos, pero difería de la secuencia de ADNc de MCP-2 derivada de médula ósea notificada en el codón 46, que codificaba una Lys en lugar de una Gln. Esta variante de MCP-2Lys46, causada por un polimorfismo de nucleótido único (SNP), se comparó biológicamente con MCP-2Gln46. Se subclonaron las regiones de codificación en el vector de expresión bacteriano pHEN1, y después de transformación de *Escherichia coli*, se recuperaron las dos variantes de proteína MCP-2 del periplasma. La degradación de Edman reveló un residuo de Gln en el extremo NH₂ en lugar de un pGlu. Se ensayaron rMCP-2Gln46 y rMCP-2Lys46 y las contrapartidas cíclicas NH₂-terminales en células monocíticas en ensayos de movilización de calcio y quimiotactismo. No se observó una diferencia significativa en la actividad biológica entre las isoformas rMCP-2Gln46 y rMCP-2Lys46. Sin embargo, para ambas variantes de MCP-2, se mostró que el piroglutamato NH₂-terminal era esencial para el quimiotactismo, pero no para la movilización de calcio. El truncamiento NH₂-terminal de rMCP-2Lys46 por la serina proteasa CD26/dipeptidil peptidasa IV (CD26/DPP IV) dio como resultado la liberación del dipéptido Gln-Pro NH₂-terminal, mientras que la MCP-2 sintética con un pGlu aminoterminal permaneció intacta. La rMCP-2Lys46(3-76) cortada con CD26/DPP IV era casi completamente inactiva

tanto en ensayos de quimiotactismo como de señalización. Estas observaciones indicaban que el pGlu NH₂-terminal en MCP-2 es necesario para la actividad quimiotáctica, pero también que protege a la proteína frente a la degradación por CD26/DPP IV (van Collie, E. y col. Biochemistry 1998 37, 12672-80).

En la presente invención, se determinó mediante análisis de CL/EM que la formación del residuo de piroglutamato N-terminal determinada en glucagón³⁻²⁹ (Pospisilik y col., 2001) y en isoformas de MCP-2 (van Coillie y col., 1998) está catalizada por QC.

Además, se probó mediante investigación con CL/EM que después de la retirada N-terminal de los dos dipéptidos Lys-Pro y Arg-Pro de la sustancia P catalizada por DP IV, se transforma la [Gln⁵]sustancia P⁵⁻¹¹ mediante QC en [pGlu⁵]sustancia P⁵⁻¹¹.

Se dan a conocer inhibidores de en el documento WO 99/61431. En particular, se dan a conocer inhibidores de DP IV que comprenden un residuo aminoacídico y un grupo tiazolidina o pirrolidina, y sales de los mismos, especialmente L-treo-isoleuciltiazolidina, L-alo-isoleuciltiazolidina, L-treo-isoleucilpirrolidina, L-alo-isoleucilpirrolidina y sales de las mismas.

Son ejemplos adicionales de inhibidores de dipeptidil peptidasa IV de bajo peso molecular agentes tales como derivados de tetrahydroisoquinolin-3-carboxamida, 2-cianopirroles y 2-cianopirrolidinas N-sustituidos, N-(glicil N'-sustituido)-2-cianopirrolidinas, N-(glicil sustituido)tiazolidinas, N-(glicil sustituido)-4-cianotiazolidinas, inhibidores de aminoacilboronoprolilo, pirrolidinas condensadas con ciclopropilo y compuestos heterocíclicos. Se describen inhibidores de dipeptidil peptidasa IV en los documentos US 6.380.398, US 6.011.155; US 6.107.317; US 6.110.949; US 6.124.305; US 6.172.081; WO 95/15309, WO 99/61431, WO 99/67278, WO 99/67279, DE 19.834.591, WO 97/40832, DE 19.616.486 C2, WO 98/19998, WO

00/07617, WO 99/38501, WO 99/46272, WO 99/38501, WO
 01/68603, WO 01/40180, WO 01/81337, WO 01/81304, WO
 01/55105, WO 02/02560 y WO 02/14271, WO 02/04610, WO
 02/051836, WO 02/068420, WO 02/076450; WO 02/083128, WO
 5 02/38541, WO 03/000180, WO 03/000181, WO 03/000250, WO
 03/002530, WO 03/002531, WO 03/002553, WO 03/002593, WO
 03/004496, WO 03/024942 y WO 03/024965.

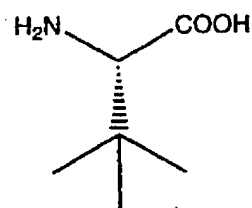
Se prefieren para uso en combinación con efectores de
 QC los inhibidores de DP IV tales como NVP-DPP728A (1-[[[2-
 10 [{5-cianopiridin-2-il}amino]etil]amino]acetil]-2-ciano-(S)-
 pirrolidina) (Novartis) como se da a conocer por Hughes y
 col. 1999 Biochemistry 38 11597- 11603, LAF-237 (1-[(3-
 hidroxiamant-1-ilamino)acetil]pirrolidin-2(S)-
 carbonitrilo) dado a conocer por Hughes y col., "Meeting of
 15 the American Diabetes Association 2002", resumen n° 272
 (Novartis), TSL-225 (ácido triptofil-1,2,3,4-
 tetrahidroisoquinolin-3-carboxílico) dado a conocer por
 Yamada y col. 1998 Bioorg. Med. Chem. Lett. 8, 1537-1540,
 2-cianopirrolidinas y 4-cianopirrolidinas como se dan a
 20 conocer por Asworth y col. 1996 Bioorg. Med. Chem. Lett. 6,
 1163-1166 y 2745- 2748, FE-999011 dado a conocer por Sudre
 y col. 2002 Diabetes 51, 1461-1469 (Ferring) y los
 compuestos dados a conocer en el documento WO 01/34594
 (Guilford), empleando dosificaciones como se indican en las
 25 referencias anteriores.

Los inhibidores de DP IV más preferidos para uso en
 combinación con efectores de QC son compuestos dipeptídicos
 en los que el aminoácido se selecciona preferiblemente de
 un aminoácido natural tal como, por ejemplo, leucina,
 30 valina, glutamina, ácido glutámico, prolina, isoleucina,
 asparagina y ácido aspártico. Los compuestos similares a
 dipéptidos usados según la invención exhiben a una
 concentración (de compuestos dipeptídicos) de 10 µM una
 reducción de la actividad de dipeptidil peptidasa IV, o de
 35 actividades de enzima análoga a DP IV, de al menos un 10%,
 especialmente de al menos un 40%. Frecuentemente, se desea
 también una reducción de la actividad de al menos un 60% o

al menos un 70% *in vivo*. Los compuestos preferidos pueden exhibir también una reducción de actividad a un máximo de un 20 ó 30%.

Son compuestos dipeptídicos preferidos N-valilprolilo,
 5 O-benzoilhidroxilamina, alanilpirrolidina,
 isoleuciltiazolidina como L-alo-isoleuciltiazolidina, L-
 treo-isoleucilpirrolidina y sales de las mismas,
 especialmente las sales fumarato, y L-alo-
 isoleucilpirrolidina y sales de la misma. Son compuestos
 10 especialmente preferidos glutaminilpirrolidina y
 glutaminiltiazolidina, H-Asn-pirrolidina, H-Asn-
 tiazolidina, H-Asp-pirrolidina, H-Asp-tiazolidina, H-
 Asp(NHOH)-pirrolidina, H-Asp(NHOH)-tiazolidina, H-Glu-
 pirrolidina, H-Glu-tiazolidina, H-Glu(NHOH)-pirrolidina, H-
 15 Glu(NHOH)-tiazolidina, H-His-pirrolidina, H-His-
 tiazolidina, H-Pro-pirrolidina, H-Pro-tiazolidina, H-Ile-
 azididina, H-lle-pirrolidina, H-L-alo-lle-tiazolidina, H-
 Val-pirrolidina y H-Val-tiazolidina y sales
 farmacéuticamente aceptables de los mismos. Se describen
 20 estos compuestos en los documentos WO 99/61431 y EP
 1.304.327.

Además, la presente invención proporciona el uso de
 efectores de QC en combinación con compuestos peptídicos
 similares al sustrato útiles para la modulación competitiva
 25 de la catálisis de dipeptidil peptidasa IV. Son compuestos
 peptídicos preferidos ácido 2-aminooctanoico-Pro-Ile, Abu-
 Pro-Ile, Aib-Pro-lle, Aze-Pro-Ile, Cha-Pro-Ile, Ile-Hyp-
 Ile, Ile-Pro-alo-Ile, Ile-Pro-*terc*-butil-Gly, Ile-Pro-Val,
 Nle-Pro-Ile, Nva-Pro-Ile, Orn-Pro-Ile, Phe-Pro-Ile, Phg-
 30 Pro-lle, Pip-Pro-Ile, Ser(Bzl)-Pro-lle, Ser(P)-Pro-Ile,
 Ser-Pro-Ile, *terc*-butil-Gly-Pro-D-Val, *terc*-butil-Gly-Pro-
 Gly, *terc*-butil-Gly-Pro-Ile, *terc*-butil-Gly-Pro-Ile-amida,
terc-butil-Gly-Pro-*terc*-butil-Gly, *terc*-butil-Gly-Pro-Val,
 Thr-Pro-Ile, Tic-Pro-Ile, Trp-Pro-Ile, Tyr(P)-Pro-Ile, Tyr-
 35 Pro-alo-lle, Val-Pro-alo-lle, Val-Pro-*terc*-butil-Gly, Val-
 Pro-Val y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos,
 en los que *terc*-butil-Gly se define como



y Ser(Bzl) y Ser(P) se definen como bencilserina y fosforilserina, respectivamente. Tyr(P) se define como fosforiltirosina. Estos compuestos se dan a conocer en el
5 documento WO 03/002593.

Son inhibidores de DP IV preferidos adicionales, que pueden usarse según la presente invención en combinación con inhibidores de QC, las peptidilcetonas, por ejemplo

- bromhidrato de 2-metilcarbonil-1-N-[(L)-alanil-(L)-valinil]-(2S)-pirrolidina,
10
- bromhidrato de 2-metilcarbonil-1-N-[(L)-valinil-(L)-prolil-(L)-valinil]-(2S)-pirrolidina,
- bromhidrato de 2-[(acetiloximetil)carbonil]-1-N-[(L)-alanil-(L)-valinil]-(2S)-pirrolidina,
- 15 • bromhidrato de 2-[(benzoiloximetil)carbonil]-1-N-[(L)-alanil]-(L)-valinil]-(2S)-pirrolidina,
- 2-[(2,6-diclorobencil)tiometil]carbonil]-1-N-[(L)-alanil]-(L)-valinil]-(2S)-pirrolidina,
- bromhidrato de 2-[(benzoiloximetil)carbonil]-1-N-
20 [glicil-(L)-valinil]-(2S)-pirrolidina,
- trifluoroacetato de 2-[(1,3)-tiazoltiazol-2-il)carbonil]-1-N-[(L)-alanil]-(L)-valinil]-(2S)-pirrolidina,
- trifluoroacetato de 2-[(benzotiazoltiazol-2-il)carbonil]-1-N-[N-[(L)-alanil]-(L)-valinil]-(2S)-
25 pirrolidina,
- trifluoroacetato de 2-[(benzotiazoltiazol-2-il)-carbonil]-1-N-[(L)-alanil]glicil]-(2S)-pirrolidina,
- trifluoroacetato de 2-[(piridin-2-il)carbonil]-1-N-[N-
30 [(L)-alanil]-(L)-valinil]-(2S)-pirrolidina

y otras sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Estos compuestos se dan a conocer en el documento WO 03/033524.

Además, según la presente invención, pueden usarse aminocetonas sustituidas en combinación con efectores de QC. Son aminocetonas sustituidas preferidas

- cloruro de 1-ciclopentil-3-metil-1-oxo-2-pentanaminio chloride,
 - cloruro de 1-ciclopentil-3-metil-1-oxo-2-butanaminio,
 - cloruro de 1-ciclopentil-3,3-dimetil-1-oxo-2-butanaminio,
 - cloruro de 1-ciclohexil-3,3-dimetil-1-oxo-2-butanaminio,
 - cloruro de 3-(ciclopentilcarbonil)-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolinio,
 - cloruro de N-(2-ciclopentil-2-oxoetil)-ciclohexanaminio
- y otras sales farmacéuticamente aceptables de las mismas.

Entre el raro grupo de proteasas específicas de prolina, se creyó originalmente que la DP IV era la única enzima unida a membrana específica de prolina como penúltimo residuo en el extremo amino de la cadena polipeptídica. Sin embargo, se han identificado otras moléculas, incluso aquellas estructuralmente no homólogas con DP IV, pero que portan la correspondiente actividad enzimática. Las enzimas tipo DP IV que se han identificado hasta ahora incluyen, por ejemplo, proteína α de activación de fibroblastos, dipeptidil peptidasa IV β , proteína tipo dipeptidil aminopeptidasa, dipeptidasa ácida N-acetilada- α -ligada, prolina dipeptidasa de células quiescentes, dipeptidil peptidasa II, atractina y proteína relacionada con dipeptidil peptidasa IV (DPP 8), DPL 1 (DPX, DP 6), DPL 2 y DPP 9 descritas en los artículos de revisión de Sedo & Malik (Sedo y Malik 2001, Biochim. Biophys. Acta, 36506, 1-10) y Abbott y Gorrell (Abbott, C. A. y Gorrell, M. D. 2002 en: Langner & Ansorge (ed.), "Ectopeptidasas". Kluwer Academic/Plenum Publishers, Nueva York, 171-195). Recientemente, se ha notificado la clonación y caracterización de dipeptidil peptidasa 10 (DPP 10) (Qi, S.

Y. y col., Biochemical Journal Immediate Publication.
Publicado el 28 de marzo de 2003 como manuscrito
BJ20021914).

Los efectores, como se usa ese término en la presente
5 memoria, se definen como moléculas que se unen a enzimas y
aumentan o reducen su actividad *in vitro* y/o *in vivo*.
Algunas enzimas tienen sitios de unión para moléculas
pequeñas que afectan a su actividad catalítica; una
molécula estimuladora se denomina activador. Las enzimas
10 pueden tener incluso múltiples sitios para reconocer más de
un activador o inhibidor. Las enzimas pueden detectar
concentraciones de una variedad de moléculas y usar esa
información para variar sus propias actividades.

Los efectores pueden modular la actividad enzimática
15 porque las enzimas pueden asumir conformaciones tanto
activas como inactivas: los activadores son efectores
positivos, los inhibidores son efectores negativos. Los
efectores actúan no sólo en los sitios activos de enzimas,
sino también en sitios reguladores o sitios alostéricos,
20 términos usados para subrayar que el sitio regulador es un
elemento de la enzima distinto del sitio catalítico y para
diferenciar esta forma de regulación de la competición
entre sustratos e inhibidores en el sitio catalítico
(Darnell, J., Lodish, H. y Baltimore, D. 1990, "Molecular
25 Cell Biology" 2ª edición, Scientific American Books, Nueva
York, página 63).

En los péptidos de la presente invención, cada residuo
aminoacídico está representado por una referencia de una
letra o de tres letras, correspondiente al nombre trivial
30 del aminoácido, según la siguiente lista convencional:

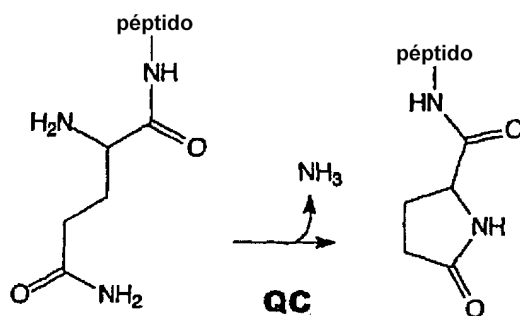
<u>Aminoácido</u>	<u>Símbolo de una</u> <u>letra</u>	<u>Símbolo de tres</u> <u>letras</u>
Alanina	A	Ala
Arginina	R	Arg
Asparagina	N	Asn
Ácido aspártico	D	Asp
Cisteína	C	Cys

Glutamina	Q	Gln
Ácido glutámico	E	Glu
Glicina	G	Gly
Histidina	H	His
Isoleucina	I	Ile
Leucina	L	Leu
Lisina	K	Lys
Metionina	M	Met
Fenilalanina	F	Phe
Prolina	P	Pro
Serina	S	Ser
Treonina	T	Thr
Triptófano	W	Trp
Tirosina	Y	Tyr
Valina	V	Val

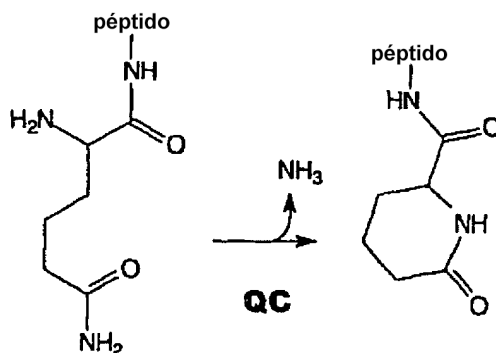
El término "QC" como se usa en la presente memoria comprende glutaminil ciclasa (QC) y enzimas tipo QC. QC y las enzimas tipo QC tienen una actividad enzimática idéntica o similar, definida además como actividad de QC. A este respecto, las enzimas tipo QC pueden diferir fundamentalmente de QC en su estructura molecular.

El término "actividad de QC" como se usa en la presente memoria se define como la ciclación intramolecular de restos de glutamina N-terminal a ácido piroglutámico (pGlu*) o de L-homoglutamina o L-β-homoglutamina N-terminal a un derivado de pirohomoglutamina cíclico con liberación de amoníaco. Véanse para ello los esquemas 1 y 2.

Esquema 1: Ciclación de glutamina por QC



Esquema 2: Ciclación de L-homoglutamina por QC



El término "EC" como se usa en la presente memoria comprende la actividad secundaria de QC y enzimas tipo QC como glutamato ciclasa (EC), definida además como actividad de EC.

El término "actividad de EC" como se usa en la presente memoria se define como la ciclación intramolecular de restos de glutamato N-terminal a ácido piroglutámico (pGlu*) por QC. Véase para ello el esquema 3.

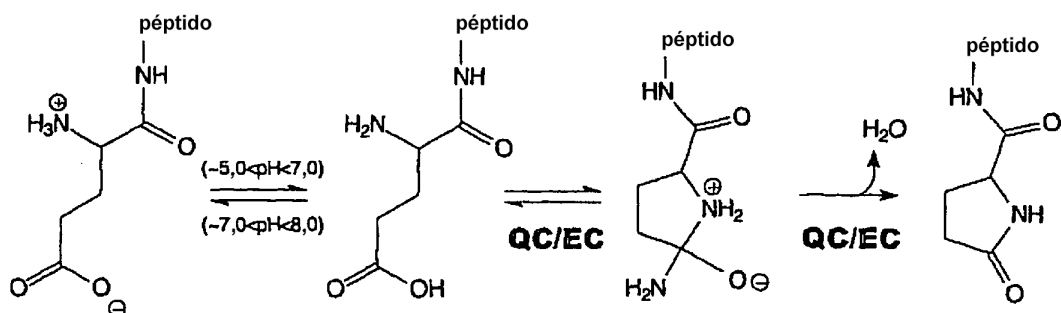
El término "enzima dependiente de metal" como se usa en la presente memoria se define como una enzima o enzimas que requieren un ión metálico unido para satisfacer su función catalítica y/o que requieren un ión metálico unido para formar la estructura catalíticamente activa.

Las moléculas que se unen a enzimas y aumentan o reducen sus actividades se denominan "efectores". Los efectos pueden modificar la actividad enzimática porque las enzimas pueden asumir conformaciones tanto activas como inactivas: los activadores son efectores positivos, los inhibidores son efectores negativos. Los efectores se unen a sitios reguladores o sitios alostéricos (del griego "otra forma"), un término usado para subrayar que el sitio regulador es un elemento de la enzima distinto del sitio catalítico y para diferenciar esta forma de regulación de la competición entre sustratos e inhibidores en el sitio catalítico.

Según realizaciones individuales de la presente invención, se prefieren los inhibidores.

Esquema 3: Ciclación N-terminal de péptidos de glutamilo no

cargados por QC (EC)



Es otro aspecto de la presente invención la identificación de nuevos sustratos fisiológicos de QC. Estos se identificaron efectuando experimentos de ciclación con péptidos de mamíferos como se describe en el ejemplo 5. Previamente, se aislaron QC humana y QC de papaya como se describe en el ejemplo 1. Los procedimientos aplicados se describen en el ejemplo 2, y la síntesis peptídica empleada se expone en el ejemplo 6. Se muestran los resultados del estudio en la Tabla 1.

Tabla 1: Nuevos sustratos fisiológicos de glutaminil ciclasa (*, determinados cualitativamente mediante experimentos de MALDI-TOF)

Sustrato	QC Humana			QC de papaya		
	K_M (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_M ($mM^{-1}s^{-1}$)	K_M (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_M ($mM^{-1}s^{-1}$)
[Gln ¹]-Gastrina	31 $\pm$ 1	54,1 $\pm$ 0,6	1745,2 $\pm$ 36,9	34 $\pm$ 2	25,8 $\pm$ 0,5	759 $\pm$ 30
[Gln ¹]-Neurotensina	37 $\pm$ 1	48,8 $\pm$ 0,4	1318,9 $\pm$ 24,8	40 $\pm$ 3	35,7 $\pm$ 0,9	893 $\pm$ 44
[Gln ³]-FPP	87 $\pm$ 2	69,6 $\pm$ 0,3	800,0 $\pm$ 14,9	232 $\pm$ 9	32,5 $\pm$ 0,4	140 $\pm$ 4
[Gln ³]-TRH	90 $\pm$ 4	82,8 $\pm$ 1,2	920,0 $\pm$ 27,6	n.d.	n.d.	n.d.
[Gln ¹]-GnRH	53 $\pm$ 3	69,2 $\pm$ 1,1	1305,7 $\pm$ 53,2	169 $\pm$ 9	82,5 $\pm$ 1,9	488,2 $\pm$ 14,8
[Gln ³]-glucagón(3-29)			*			*
[Gln ³]-sustancia P(5-11)			*			*

Se efectuaron todos los análisis en el intervalo óptimo de actividad y estabilidad de QC humana o de planta, como se demuestra en el ejemplo 4.

Se enumeran en la tabla 2 las secuencias aminoacídicas de los péptidos fisiológicamente activos que tienen un residuo de glutamina N-terminal, y que son por lo tanto sustratos para la enzima QC:

Tabla 2: Secuencias aminoacídicas de péptidos fisiológicamente activos con un residuo de glutamina N-terminal

Péptido	Secuencia aminoacídica	Función
Gastrina 17 Swiss Prot: P01350	QGPWL EEEEEAYGWM DF (amida)	La gastrina estimula la mucosa del estómago para producir y secretar ácido clorhídrico y el páncreas para secretar sus enzimas digestivas. Estimula también la contracción del músculo liso y aumenta la circulación sanguínea y la secreción de agua en estómago e intestino
Neurotensina Swiss Prot: P30990	QLYENKPRRP YIL	La neurotensina desempeña un papel endocrino o paracrino en la regulación del metabolismo de grasas. Causa la contracción de músculo liso.
FPP	QEP amida	Un tripéptido relacionado con la hormona de liberación de tirotropina (TRH), se encuentra en plasma seminal. Evidencias recientes obtenidas <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> han mostrado que la FPP desempeña un papel importante en la regulación de la fertilidad del esperma
TRH Swiss Prot: P20396	QHP amida	La TRH funciona como regulador de la biosíntesis de TSH en la glándula pituitaria anterior y como neurotransmisor/ neuromodulador en los sistemas nervioso central y periférico

GnRH Swiss Prot: P01148	QHWSYGL RP(G) amida	La GnRH estimula la secreción de gonadotropinas, estimula la secreción de las hormonas tanto luteinizante como estimulante de folículos
CCL16 (citocina A16 inducible pequeña) Swiss Prot: O15467	QPKVPEW VNTPTCCLK YYEKVLPRRL VVGYSKALNC HLPATIFVTK RNREVCTNPN DDWVQEYIKD PNLPLLPTRN LSTVKIITAK NGQPQLLSQ	Muestra actividad quimiotáctica inducible por linfocitos y monocitos pero no por neutrófilos. Muestra también una potente actividad mielosupresora, suprime la proliferación de células progenitoras mieloides. La SCYA16 recombinante muestra actividad quimiotáctica para monocitos y monocitos THP-1, pero no para linfocitos y neutrófilos en reposo. Induce un flujo de calcio en células THP-1 que se habían desensibilizado mediante la expresión previa de RANTES
CCL8 (citocina A8 inducible pequeña) Swiss Prot: P80075	QPDSVSI PITCCFNVIN RKIPIQRLES YTRITNIQCP KEAVIFKTKR GKEVCADPKE RWVRDSMKHL DQIFQNLKP	Factor quimiotáctico que atrae monocitos, linfocitos, basófilos y eosinófilos. Puede desempeñar un papel en neoplasia y respuestas inflamatorias del hospedador. Esta proteína puede unirse a heparina

CCL2 (citocina A2 inducible pequeña) Swiss Prot: P13500	QPDAINA PVTCCYNFTN RKISVQRLAS YRRITSSKCP KEAVIFKTIV AKEICADPKQ KWVQDSMDHL DKQTQTPKT	Factor quimiotáctico que atrae monocitos y basófilos pero no neutrófilos ni eosinófilos. Aumenta la actividad antitumoral monocítica. Se ha implicado en la patogénesis de enfermedades caracterizadas por infiltrados monocíticos como psoriasis, artritis reumatoide o aterosclerosis. Puede estar implicado en la agrupación de monocitos en la pared arterial durante el proceso patológico de la aterosclerosis. Se une a CCR2 y CCR4.
CCL18 (citocina A18 inducible pequeña) Swiss Prot: P55774	QVGTKNELC CLVYTSWQIP QKFIVDYSET SPQCPKPGVI LLTKRGRQIC ADPNKKWVQK YISDLKLNA	Factor quimiotáctico que atrae linfocitos pero no monocitos ni granulocitos. Puede estar implicado en la migración de linfocitos B a folículos de linfocitos B en nódulos linfáticos. Atrae a linfocitos T no expuestos hacia células dendríticas y macrófagos activados en nódulos linfáticos, tiene actividad quimiotáctica para linfocitos T no expuestos, linfocitos T CD4+ y CD8+, y por tanto puede desempeñar un papel en las respuestas inmunitarias tanto humoral como mediada por célula.

Fractalcina (neurotactina) Swiss Prot: P78423	QHHGVT KCNITCSKMT SKIPVALLIH YQQNQASCGK RAIILETRQH RLFCADPKEQ WVKDAMQHLD RQAAALTRNG GTFEKQIGEV KPRTTPAAGG MDESVVLEPE ATGESSSLEP TPSSQEAQRA LGTSPLEPTG VTGSSGTRL PTPKAQDGGP VGTELFRVPP VSTAATWQSS APHQPGPSLW AEAKTSEAPS TQDPSTQAST ASSPAPEENA PSEGQRVWGQ GQSPRPENSL EREEMGPVPA HTDAFQDWGP GSMahvsvvp VSSEGTPSRE PVASGSWTPK AEEPIHATMD PQRLGVLITP VPDAQATR QAVGLLAFLG LLFCLGVAMF TYQSLQGCPR KMAGEMA EGL RYIPRSCGSN SYVLVPV	La forma soluble es quimiotáctica de linfocitos T y monocitos, pero no de neutrófilos. La forma unida a membrana promueve la adhesión de estos leucocitos a células endoteliales. Puede desempeñar un papel en la regulación de los procesos de adhesión y migración de leucocitos al endotelio. Se une a cx3cr1
CCL7 (citocina A7 inducible pequeña) Swiss Prot.: P80098	QPVGIN T STTCCYRFIN KKIPKQRLES YRRTTSSHCP REAVIFKTKL DKEICADPTQ KWVQDFMKHL DKKTQTPKL	Factor quimiotáctico que atrae monocitos y eosinófilos, pero no neutrófilos. Aumenta la actividad antitumoral monocítica. Induce también la liberación de gelatinasa B. Esta proteína puede unirse a heparina. Se une a CCR1, CCR2 y CCR3

Orexina A (hipocretina 1) Swiss Prot.: O43612	QPLPDCCRQK TCSCRLYELL HGAGNHAAGI LTL	Neuropéptido que desempeña un papel significativo en la regulación de la ingesta de alimento y el sueño-vigilia, posiblemente coordinando las complejas respuestas de comportamiento y fisiológicas de estas funciones homeostáticas complementarias. Desempeña también un papel más amplio en la regulación homeostática del metabolismo energético, la función autónoma, el equilibrio hormonal y la regulación de fluidos corporales. La orexina A se une tanto a OX1R como a OX2R con una alta afinidad.
Sustancia P	RPK PQQFFGLM	Pertenece a las taquicininas. Las taquicininas son péptidos activos que excitan neuronas, provocan respuestas de comportamiento, son potentes vasodilatadores y secretagogos y contraen (directa o indirectamente) muchos músculos lisos.

En una cuarta realización, se identificaron los péptidos [Gln¹]gastrina (de 17 y 34 aminoácidos de longitud), [Gln¹]neurotensina y [Gln¹]FPP como nuevos sustratos fisiológicos de QC. Gastrina, neurotensina y FPP comprenden un residuo de pGlu en su posición N-terminal. Se ha mostrado que este residuo de pGlu N-terminal se formó a

partir de glutamina N-terminal mediante catálisis por QC para todos los péptidos. Como resultado, estos péptidos se activan en términos de su función biológica tras la conversión del residuo de glutamina N-terminal en pGlu.

5 Las células transductoras transepiteliales, particularmente la célula de gastrina (G), coordinan la secreción de ácido gástrico con la llegada de alimento al estómago. Recientes trabajos han mostrado que se generan múltiples productos activos a partir del precursor de
10 gastrina, y que hay múltiples puntos de control en la biosíntesis de gastrina. Los precursores e intermedios biosintéticos (progastrina y Gly-gastrinas) son presuntos factores de crecimiento; sus productos, las gastrinas amidadas, regulan la proliferación de células epiteliales,
15 la diferenciación de células parietales productoras de ácido y de células similares a enterocromafina (ECL) secretoras de histamina, y la expresión de genes asociados a la síntesis de histamina y el almacenamiento en células ECL, así como estimulan fuertemente la secreción ácida. La
20 gastrina estimula también la producción de miembros de la familia del factor de crecimiento epidérmico (EGF), que a su vez inhiben la función de células parietales pero estimulan el crecimiento de células epiteliales superficiales. Las concentraciones de gastrina en el plasma
25 son elevadas en sujetos con *Helicobacter pylori*, que se sabe que tienen un riesgo aumentado de enfermedad por úlcera duodenal y cáncer gástrico (Dockray, G. J. 1999 J. Physiol. 15 315-324).

La hormona peptídica gastrina, liberada de células G
30 antrales, es conocida por estimular la síntesis y liberación de histamina a partir de células ECL en la mucosa oxíntica mediante los receptores CCK-2. La histamina movilizada induce la secreción de ácido mediante unión a los receptores H(2) localizados en células parietales.
35 Estudios recientes sugieren que la gastrina, tanto en su forma totalmente amidada como menos procesada (progastrina y gastrina extendida con glicina), es también un factor de

crecimiento para el tracto gastrointestinal. Se ha establecido que el efecto trófico principal de la gastrina amidada es por la mucosa oxíntica del estómago, donde causa una proliferación aumentada de células madre gástricas y
5 células ECL, dando como resultado una masa de células parietales y ECL aumentada. Por otro lado, la diana trófica principal de la gastrina menos procesada (por ejemplo, gastrina extendida con glicina) parece ser la mucosa colónica (Koh, T. J. y Chen, D. 2000 Regul. Pept. 9337-44).

10 La neurotensina (NT) es un neuropéptido implicado en la fisiopatología de la esquizofrenia que modula específicamente sistemas neurotransmisores que se ha demostrado anteriormente que están desregulados en este trastorno. Los estudios clínicos en que se han medido las
15 concentraciones de NT en fluido cerebroespinal (CSF) revelaron un subconjunto de pacientes esquizofrénicos con concentraciones de NT en CSF reducidas que se recuperan mediante tratamiento con fármacos antipsicóticos eficaces. Existen también considerables evidencias que concuerdan con
20 la implicación de sistemas de NT en el mecanismo de acción de los fármacos antipsicóticos. Los efectos de comportamiento y bioquímicos de NT administrada por vía central se parecen notablemente a los de fármacos antipsicóticos administrados por vía sistémica, y los
25 fármacos antipsicóticos aumentan la neurotransmisión de NT. Esta concatenación de hallazgos condujo a la hipótesis de que la NT funciona como antipsicótico endógeno. Además, los fármacos antipsicóticos típicos y atípicos alteran diferencialmente la neurotransmisión de NT en las regiones
30 terminales de dopamina nigroestriada y mesolímbica, y estos efectos son predictores de la predisposición a efectos secundarios y la eficacia, respectivamente (Binder, E. B. y col. 2001 Biol. Psychiatry 50 856-872).

35 El péptido promotor de la fertilización (FPP), un tripéptido relacionado con la hormona liberadora de tirotrófina (TRH), se encuentra en plasma seminal. Evidencias recientes obtenidas *in vitro* e *in vivo* han

mostrado que el FPP desempeña un papel importante en la regulación de la fertilidad del esperma. Específicamente, el FPP estimula inicialmente espermatozoos no fertilizantes (incapacitados) a "ponerse en marcha" y volverse fértiles más rápidamente, pero entonces detiene la capacitación de modo que los espermatozoos no experimentan una pérdida de acrosoma espontánea y por lo tanto no pierden potencial fertilizante. Estas respuestas se imitan, e incluso aumentan, por la adenosina, conocida por regular la ruta de transducción de señal de adenilil ciclasa (AC)/AMPc. Se ha mostrado que tanto FPP como adenosina estimulan la producción de AMPc en células incapacitadas, pero la inhiben en células capacitadas, con los receptores de FPP interaccionando de algún modo con los receptores de adenosina y proteínas G para conseguir la regulación de AC. Estos eventos afectan al estado de fosforilación de la tirosina de diversas proteínas, algunas que son importantes en la "puesta en marcha" inicial, otras que están posiblemente implicadas en la reacción de acrosoma misma. La calcitonina y angiotensina II, también encontradas en plasma seminal, tienen efectos similares *in vitro* sobre espermatozoos incapacitados y pueden aumentar las respuestas a FPP. Estas moléculas tienen efectos similares *in vivo*, que afectan a la fertilidad mediante la estimulación y posterior mantenimiento del potencial de fertilización. Tanto las reducciones en la disponibilidad de FPP, adenosina, calcitonina y angiotensina II como los defectos en sus receptores contribuyen a la infertilidad masculina (Fraser, L. R. y Adeoya-Osiguwa, S. A. 2001 Vitam. Horm. 63, 1-28).

Se han estudiado recientemente en ensayos clínicos varias vacunas basadas en péptido de linfocitos T citotóxicos contra hepatitis B, virus de inmunodeficiencia humana y melanoma. Un candidato a vacuna de melanoma interesante solo o en combinación con otros antígenos tumorales es el decapeptido ELA. Este péptido es un análogo del péptido inmunodominante antigénico Melan-A/MART-1, con

un ácido glutámico N-terminal. Se ha notificado que el grupo amino y el grupo γ -carboxílico de los ácidos glutámicos, así como el grupo amino y el grupo γ -carboxamida de las glutaminas, se condensan fácilmente formando derivados de piroglutamina. Para superar este problema de estabilidad, se han desarrollado varios péptidos de interés farmacéutico con un ácido piroglutámico en lugar de glutamina o ácido glutámico, sin pérdida de propiedades farmacológicas. Desgraciadamente, comparado con ELA, el derivado de ácido piroglutámico (PyrELA) y también el derivado con caperuza de acetilo N-terminal (AcELA) no consiguieron desencadenar la actividad de linfocitos T citotóxicos (CTL). A pesar de las modificaciones aparentemente menores introducidas en PyrELA y AcELA, estos dos derivados tienen probablemente menor afinidad que ELA por el complejo de histocompatibilidad mayor de clase I específico. En consecuencia, para conservar toda la actividad de ELA, debe evitarse la formación de PyrELA (Beck A. y col. 2001, J. Pept. Res. 57 (6): 528-38). Recientemente, se ha encontrado que también la enzima glutaminil ciclasa (QC) está sobreexpresada en melanomas (Ross D. T y col., 2000, Nat. Genet. 24: 227-35).

Las expansiones de poliglutamina en varias proteínas conducen a trastornos neurodegenerativos tales como enfermedad de Parkinson y enfermedad de Kennedy. El mecanismo para ello permanece desconocido en gran medida. Las propiedades bioquímicas de las repeticiones de poliglutamina sugieren una posible explicación: la escisión endolítica en un enlace glutaminilo-glutaminilo seguido de la formación de piroglutamato puede contribuir a la patogénesis mediante el aumento de la estabilidad catabólica, la hidrofobicidad, la amiloidogenicidad y la neurotoxicidad de las proteínas de poliglutaminilo (Saïdo, T; Med. Hypotheses (2000) Mar; 54 (3): 427-9).

La inhibición de una QC de mamífero se detectó inicialmente sólo para 1,10-fenantrolina y 6-metilpterina reducida (Busby, W. H. J. y col. 1987 J. Biol. Chem. 262,

8532-8536). El EDTA no inhibía la QC, por lo tanto se concluyó que la QC no es una enzima dependiente de metal (Busby, W. H. J. y col. 1987 J. Biol. Chem. 262, 8532-8536, Bateman, R. C. J. y col. 2001 Biochemistry 40, 11246-11250, Booth, R. E. y col. 2004 BMC Biology 2). En la presente invención, sin embargo, se muestra que la QC humana y otras QC animales son enzimas dependientes de metal, como se revela por las características de inhibición de QC por 1,10-fenantrolina, ácido dipicolínico, 8-hidroxiquinolina y otros quelantes (Figuras 18, 19) y por la reactivación de QC por iones metálicos de transición (Figura 20). Finalmente, se expone la dependencia de metal mediante una comparación de secuencia con otras enzimas dependientes de metal, que muestran una conservación de residuos aminoacídicos quelantes también en QC humana (Figura 21). La interacción de los compuestos con el ión metálico unido al sitio activo representa un modo general de reducir o inhibir la actividad de QC.

Se muestra en la presente invención que los derivados de imidazol son potentes inhibidores de QC. Usando el ensayo continuo (para los detalles, véase el ejemplo 2), se analizaron muchos derivados de imidazol respecto a su capacidad de inhibir la QC humana como miembro de las QC de mamífero altamente conservadas.

Por tanto, la presente invención proporciona derivados de imidazol e histidina y sus derivados como efectores reductores de la actividad de QC y sus características en términos de tipo y potencia de inhibición. Se muestran en las tablas 3 y 4 las estructuras y valores de K_i . Se describen con detalle los resultados en el ejemplo 7.

Tabla 3: Constantes de inhibición de derivados de imidazol en la reacción catalizada por QC humana. Se efectuaron las determinaciones a 30°C en Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0, que contenía EDTA 5 mM.

Compuesto	Valor de K_i (mM)	Estructura
Estructuras básicas		
Imidazol	$0,103 \pm 0,004$	

Bencimidazol	0,138 ± 0,005
Derivados de N-1	
1-Bencilimidazol	0,0071 ± 0,0003
1-Metilimidazol	0,030 ± 0,001
1-Vinilimidazol	0,049 ± 0,002
Diimidazolidida de ácido oxálico	0,078 ± 0,002
N-Acetilimidazol	0,107 ± 0,003
N-(Trimetilsilil)imidazol	0,167 ± 0,007
N-Benzoilimidazol	0,174 ± 0,007
1-(2-Oxo-2-fenilet-il)imidazol	0,184 ± 0,005
1-(3-Aminopropil)imidazol	0,41 ± 0,01
1-Fenilimidazol	Sin inhibición
1,1'-Sulfonildiimidazol	Sin inhibición
Derivados de C4(5)	
N-ω-Acetilhistamina	0,017 ± 0,001
L-Histidinamida	0,56 ± 0,04
H-His-Trp-OH	0,60 ± 0,03
L-Histidinol	1,53 ± 0,12
L-Histidina	4,4 ± 0,2
4-Imidazolcarboxaldehído	7,6 ± 0,7
Éster metílico del ácido imidazol-4-carbónico	14,5 ± 0,6
L-Histamina	0,85 ± 0,04
Derivados de C-4,5	
5-Hidroximetil-4-metilimidazol	0,129 ± 0,005

Amida del ácido 4- 15,5 ± 0,5
aminoimidazol-5-
carbónico

4,5-Difenilimidazol Sin inhibición

4,5-Dicianoimidazol Sin inhibición

Derivados de C-2

2- 0,165 ± 0,004

Metilbencilimidazol

2-Etil-4- 0,58 ± 0,04

metilimidazol

2-Aminobencilimidazol 1,8 ± 0,1

2-Cloro-1*H*- Sin inhibición

bencilimidazol

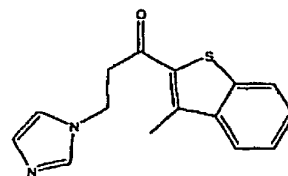
Otros

3-(1*H*-Imidazol-1- 0,0025 ± 0,0001

il)-1-(3-metil-

benzo[b]tiofen-2-

il)propan-1-ona



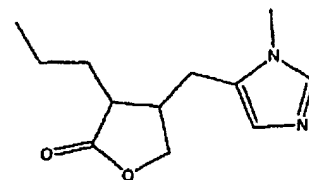
4-[(1-Metil-1*H*- 0,0067 ± 0,0003

imidazol-5-

il)metil]-3-

propildihidrofuran-

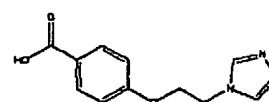
2-(3*H*)-ona



Ácido 4-[(2-1*H*- 0,0034 ± 0,0001

imidazol-1-

il)etoxi]benzoico

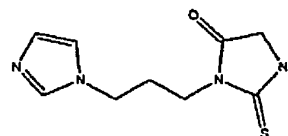


3-[3-(1*H*-imidazol- 0,00041 ± 0,00001

1-il)propil]-2-

tioxoimidazolidin-

4-ona



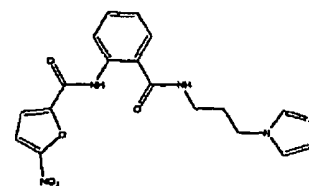
5-Nitro-2-[2-([3- 0,0066 ± 0,0004

(1*H*-imidazol-1-

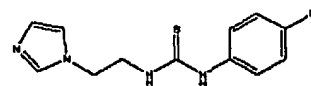
il)propil}amino]car

bonil)-

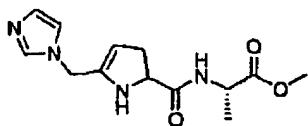
fenil]furamida



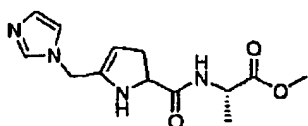
N-(4-Clorofenil)-
N'-[2-(1*H*-imidazol-
1-il)etil]tiourea



0,0322 ± 0,0007

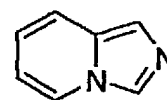


n.d.



Imidazo[1,5-
a]piridina

0,0356 ± 0,0005



(2*S*)-2-{[(2*S*)-2-
Amino-5-(1*H*-
imidazol-1-
ilamino)-5-
oxopentanoil]-
amino}-3-
metilbutanoato de
metilo

0,164 ± 0,004

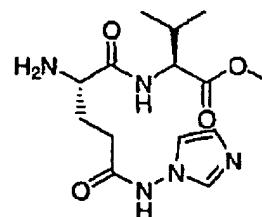


Tabla 4: Inhibición de QC por L-histamina y sus dos metabolitos biológicos (también conocidos como tele-metilhistamina)

Compuesto	Valor de Ki (mM)	Estructura
L-Histamina	0,85 ± 0,04	
3-Metil-4-(β-aminoetil)imidazol	0,120 ± 0,004	
1-Metil-4-(β-aminoetil)imidazol	n.i.	

Sorprendentemente, durante la caracterización de la

actividad enzimática, se descubrió que, además del residuo de glutaminilo N-terminal, los residuos de β -homoglutaminilo N-terminal satisfacen también las propiedades como sustratos de QC de plantas y mamíferos. Se
5 convirtió el residuo de β -homoglutaminilo N-terminal en un anillo de lactama de 5 miembros mediante catálisis de QC humana y de papaya, respectivamente. Se describen los resultados en el ejemplo 5. Se ilustra el procedimiento aplicado en el ejemplo 2 y se efectuó la síntesis peptídica
10 como se describe en el ejemplo 6.

Estos compuestos pueden convertirse en sales de adición de ácido, especialmente sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables.

Las sales de los compuestos de la invención pueden
15 estar en forma de sales inorgánicas u orgánicas.

Estos compuestos pueden convertirse en y usarse como sales de adición de ácido, especialmente sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables. La sal farmacéuticamente aceptable toma generalmente una forma en
20 que se protona una cadena lateral básica con un ácido inorgánico u orgánico. Los ácidos orgánicos o inorgánicos representativos incluyen ácido clorhídrico, bromhídrico, perclórico, sulfúrico, nítrico, fosfórico, acético, propiónico, glicólico, láctico, succínico, maleico,
25 fumárico, málico, tartárico, cítrico, benzoico, mandélico, metanosulfónico, hidroxietanosulfónico, bencenosulfónico, oxálico, pamoico, 2-naftalenosulfónico, p-toluenosulfónico, ciclohexanosulfámico, salicílico, sacarínico o trifluoroacético. Se pretende que todas las formas de sal
30 de adición de ácido farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la presente invención estén incluidas en el alcance de esta invención.

A la vista de la estrecha relación entre los compuestos libres y los compuestos en forma de sus sales,
35 siempre que se designe un compuesto en este contexto, se pretende también la sal correspondiente, a condición de que ésta sea posible o apropiada según las circunstancias.

Cuando los compuestos de la solicitud tienen al menos un centro quiral, pueden existir en consecuencia como enantiómeros. Cuando los compuestos poseen dos o más centros quirales, pueden existir adicionalmente como diastereómeros. Se entiende que todos dichos isómeros y mezclas de los mismos están comprendidos dentro del alcance de la presente invención. Además, algunas de las formas cristalinas de los compuestos pueden existir como polimorfos y como tales se pretende que estén incluidos en la presente invención. Además, algunos de los compuestos pueden formar solvatos con agua (concretamente hidratos) o disolventes orgánicos comunes, y se pretende también que dichos solvatos estén comprendidos dentro del alcance de esta invención.

Los compuestos, incluyendo sus sales, pueden obtenerse también en forma de sus hidratos, o incluir otros disolventes usados para su cristalización.

En una realización adicional, la presente invención proporciona un uso para prevenir o tratar una afección mediada por la inhibición de la actividad enzimática de QC en un sujeto necesitado de ello, de los inhibidores de glutaminil ciclasa de la presente invención o composiciones farmacéuticas de los mismos en una cantidad y en un régimen de dosificación terapéuticamente eficaz para tratar la afección. Adicionalmente, la presente invención incluye el uso de inhibidores de QC de esta invención, y sus formas de sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptables, para la preparación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de una afección mediada por la inhibición de la actividad de QC en un sujeto. El compuesto puede administrarse a un paciente por cualquier vía de administración convencional incluyendo, pero sin limitación, intravenosa, oral, subcutánea, intramuscular, intradérmica, parenteral y combinaciones de las mismas.

En una realización preferida, la presente invención proporciona inhibidores de glutaminil ciclasa, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, para uso para

la prevención o el tratamiento de una enfermedad seleccionada de enfermedad de Alzheimer y síndrome de Down. Adicionalmente, la presente invención proporciona el uso de inhibidores de glutaminil ciclasa, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, para la preparación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de una enfermedad seleccionada de enfermedad de Alzheimer y síndrome de Down.

En una forma preferida adicional de ejecución, la invención se refiere a composiciones farmacéuticas, es decir, a medicamentos que contienen al menos un inhibidor de glutaminil ciclasa o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, opcionalmente en combinación con uno o más vehículos y/o disolventes farmacéuticamente aceptables.

En una realización preferida adicional, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende al menos un inhibidor de glutaminil ciclasa, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso para la prevención o el tratamiento de una enfermedad seleccionada de enfermedad de Alzheimer y síndrome de Down. Adicionalmente, la presente invención proporciona el uso de una composición farmacéutica que comprende al menos un inhibidor de glutaminil ciclasa, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para la preparación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de una enfermedad seleccionada de enfermedad de Alzheimer y síndrome de Down.

Las composiciones farmacéuticas pueden estar, por ejemplo, en forma de formulaciones parenterales o entéricas y contener vehículos apropiados, o pueden estar en forma de formulaciones orales que pueden contener vehículos apropiados para administración oral. Preferiblemente, están en forma de formulaciones orales.

Los efectores de la actividad de QC administrados según la invención pueden emplearse en formulaciones o complejos de formulación administrables farmacéuticamente como inhibidores o en combinación con inhibidores,

sustratos, seudosustratos, inhibidores de la expresión de QC, proteínas de unión o anticuerpos de aquellas proteínas enzimáticas que reducen la concentración de proteína QC en mamíferos. Los compuestos de la invención hacen posible
5 ajustar individualmente el tratamiento a pacientes y enfermedades, siendo posible en particular evitar intolerancias, alergias y efectos secundarios individuales.

Los compuestos exhiben también diferentes grados de actividad en función del tiempo. Se da así la oportunidad
10 al médico que proporciona tratamiento de responder de forma diferente a la situación individual de los pacientes: puede ajustar con precisión, por un lado, la velocidad e inicio de la acción y, por otro lado, la duración de la acción y especialmente la intensidad de la acción.

Un uso preferido según la invención representa un
15 nuevo enfoque para la prevención o el tratamiento de una afección mediada por la inhibición de la actividad enzimática de QC en mamíferos. Es ventajosamente sencillo, susceptible de aplicación comercial y adecuado para uso,
20 especialmente en el tratamiento de enfermedades que están basadas en la concentración desequilibrada de sustratos de QC fisiológicamente activos, por ejemplo los enumerados en las Tablas 1 y 2, en medicina de mamíferos y especialmente humana.

Los compuestos pueden administrarse ventajosamente,
25 por ejemplo, en forma de preparaciones farmacéuticas que contienen el ingrediente activo en combinación con aditivos acostumbrados como diluyentes, excipientes y/o vehículos conocidos en la técnica anterior. Por ejemplo, pueden
30 administrarse por vía parenteral (por ejemplo, i.v. en disolución salina fisiológica) o entérica (por ejemplo, por vía oral formulada con vehículos acostumbrados).

Dependiendo de su estabilidad endógena y de sus biodisponibilidad, pueden administrarse una o más dosis de
35 los compuestos al día para conseguir la normalización deseada de los valores de glucosa sanguínea. Por ejemplo, dicho intervalo de dosificación en seres humanos puede

estar en el intervalo de aproximadamente 0,01 mg a 250,0 mg al día, preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 0,01 a 100 mg de compuesto por kilogramo de peso corporal.

Al administrar inhibidores de la actividad de QC a un mamífero, podría ser posible prevenir o aliviar o tratar afecciones seleccionadas de enfermedad de Alzheimer y síndrome de Down.

Los compuestos usados según la invención pueden convertirse en consecuencia de manera conocida *per se* en formulaciones convencionales tales como, por ejemplo, comprimidos, cápsulas, grageas, píldoras, supositorios, gránulos, aerosoles, jarabes, emulsiones de tipo líquido, sólido y crema y suspensiones y disoluciones, usando vehículos y aditivos o disolventes inertes no tóxicos farmacéuticamente aceptables. En cada una de esas formulaciones, los compuestos terapéuticamente eficaces están preferiblemente presentes a una concentración de aproximadamente 0,1 a 80% en peso, más preferiblemente de 1 a 50% en peso, de la mezcla total, es decir, en cantidades suficientes para obtener la amplitud de dosificación mencionada.

Las sustancias pueden usarse como medicamentos en forma de grageas, cápsulas, cápsulas masticables, comprimidos, gotas, jarabes o también como supositorios o pulverizadores nasales.

Las formulaciones pueden prepararse ventajosamente, por ejemplo, expandiendo el ingrediente activo con disolventes y/o vehículos, opcionalmente con el uso de emulsionantes y/o dispersantes, siendo posible, por ejemplo en el caso en que se usa agua como diluyente, usarse opcionalmente disolventes orgánicos como disolventes auxiliares.

Los ejemplos de excipientes útiles con respecto a la presente invención incluyen: agua, disolventes orgánicos no tóxicos tales como parafinas (por ejemplo, fracciones de aceite natural); aceites vegetales (por ejemplo, aceite de semilla de colza, aceite de cacahuete, aceite de sésamo);

alcoholes (por ejemplo, alcohol etílico, glicerol);
glicoles (por ejemplo, propilenglicol, polietilenglicol);
vehículos sólidos tales como, por ejemplo, minerales en
polvo naturales (por ejemplo, sílice de alta dispersión,
5 silicatos), azúcares (por ejemplo azúcar crudo, lactosa y
dextrosa); emulsionantes tales como emulsionantes no
iónicos y aniónicos (por ejemplo, ésteres de ácido graso
polioxietilénico, éteres de alcohol graso polioxietilénico,
sulfonatos de alquilo y sulfonatos de arilo), dispersantes
10 (por ejemplo, lignina, licores de sulfito, metilcelulosa,
almidón y polivinilpirrolidona) y lubricantes (por ejemplo,
estearato de magnesio, talco, ácido esteárico y
laurilsulfato de sodio) y opcionalmente aromatizantes.

La administración puede llevarse a cabo de la manera
15 habitual, preferiblemente por vía entérica o parenteral,
especialmente por vía oral. En el caso de administración
entérica, los comprimidos pueden contener además de los
vehículos mencionados aditivos adicionales tales como
citrato de sodio, carbonato de calcio y fosfato de calcio,
20 junto con diversos aditivos tales como almidón,
preferiblemente almidón de patata, gelatina y similares.
Además, pueden usarse simultáneamente para la formación de
comprimidos lubricantes tales como estearato de magnesio,
laurilsulfato de sodio y talco. En el caso de suspensiones
25 acuosas y/o elixires pretendidos para administración oral,
pueden añadirse diversos correctores del sabor o colorantes
a los ingredientes activos además de los excipientes
anteriormente mencionados.

En el caso de administración parenteral, pueden
30 emplearse disoluciones de los ingredientes activos que usan
vehículos líquidos adecuados. En general, se ha encontrado
ventajoso administrar, en el caso de administración
intravenosa, cantidades de aproximadamente 0,01 a 2,0
mg/kg, preferiblemente de aproximadamente 0,01 a 1,0 mg/kg,
35 de peso corporal al día para obtener resultados eficaces y,
en el caso de administración entérica, la dosificación es
de aproximadamente 0,01 a 2 mg/kg, preferiblemente de

aproximadamente 0,01 a 1 mg/kg, de peso corporal al día.

No obstante, puede ser necesario en algunos casos desviarse de las cantidades indicadas, dependiendo del peso corporal del animal experimental o paciente, o del tipo de vía de administración, pero también basándose la especie de animal y su respuesta individual al medicamento o en el intervalo en el que se lleva a cabo la administración. En consecuencia, en algunos casos puede ser suficiente usar menos de la cantidad mínima anteriormente mencionada, mientras que en otros casos tendrá que superarse el límite superior mencionado. En casos en que se administran cantidades relativamente grandes, puede ser aconsejable dividir esas cantidades en varias dosis individuales durante el día. Para administración en medicina humana, se proporciona la misma amplitud de dosificación. Las notas anteriores se aplican análogamente en ese caso.

Ejemplos de formulaciones farmacéuticas

1. Cápsulas que contienen 100 mg de un compuesto de la invención por cápsula:

Se prepara para aproximadamente 10.000 cápsulas una disolución de la siguiente composición:

Compuesto de la invención	1,0 kg
Glicerol	0,5 kg
Polietilenglicol	3,0 kg
Agua	<u>0,5 kg</u>
	5,0 kg

Se introduce la disolución en cápsulas de gelatina blanda de manera conocida *per se*. Las cápsulas son adecuadas para masticar o tragar.

2. Comprimidos o comprimidos o grageas recubiertos que contienen 100 mg de un compuesto de la invención:

Las siguientes cantidades se refieren a la preparación de 100.000 comprimidos:

compuesto de la invención	
finamente molido	10,0 kg
glucosa	4,35 kg
lactosa	4,35 kg

almidón 4,50 kg

celulosa finamente molida 4,50 kg

Se mezclan los constituyentes anteriores y se proporciona entonces una disolución preparada a partir de

5 polivinilpirrolidona 2,0 kg

polisorbato 0,1 kg

y agua aprox. 5,0 kg

y se granula de manera conocida *per se* tamizando la masa húmeda y, después de la adición de 0,2 kg de estearato de magnesio, secándola. Se procesa la mezcla de comprimido acabada de 30,0 kg para formar comprimidos convexos de 300 mg de peso. Idealmente, los comprimidos pueden recubrirse o recubrirse con azúcar de manera conocida *per se*.

Las composiciones farmacéuticas definidas a lo largo de la memoria descriptiva contienen ventajosamente una combinación de al menos un efector de la actividad de QC y al menos un inhibidor de DP IV. Dichas composiciones farmacéuticas son especialmente útiles para el tratamiento de enfermedad de Alzheimer y síndrome de Down.

20 ***Ejemplo 1: Preparación de QC humana y de papaya***

Cepas de hospedador y medios

Se cultivó *Pichia pastors* de cepa X33 (AOX1, AOX2), usada para la expresión de QC humana, se transformó y se analizó según las instrucciones del fabricante (Invitrogen). Se prepararon los medios necesarios para *P. pastoris*, concretamente medio complejo de glicerol tamponado (BMGY) o medio complejo de metanol (BMMY), y se preparó el medio de sales basales de fermentación según las recomendaciones del fabricante.

30 Clonación molecular de vectores plasmídicos que codifican la QC humana

Se realizaron todos los procedimientos de clonación aplicando técnicas de biología molecular estándar. Para expresión en levadura, se usó el vector pPICZαB (Invitrogen). Se usó el vector pQE-31 (Qiagen) para expresar la QC humana en *E. coli*. Se fusionó el ADNc de QC madura a partir del codón 38 en fase con el plásmido que

codifica el marcaje de 6 x histidina. Después de amplificación utilizando los cebadores pQCyc-1 y pQCyc-2 (Tabla 1) y subclonación, se insertó el fragmento en el vector de expresión empleando los sitios de restricción de SphI e HindIII.

Transformación de *P. pastoris* y expresión a miniescala

Se amplificó ADN de plásmido en *E. coli* JM109 y se purificó según las recomendaciones del fabricante (Qiagen). En el plásmido de expresión usado, pPICZαB, se proporcionan tres sitios de restricción para linealización. Puesto que SacI y BstXI cortan dentro del ADNc de QC, se eligió a PmeI para linealización. Se linealizaron 20-30 µg de ADN de plásmido con PmeI, se precipitó con etanol y se disolvió en agua desionizada estéril. Se aplicaron entonces 10 µg de ADN para transformación de células *P. pastoris* competentes mediante electroporación según las instrucciones del fabricante (BioRad). Se realizó la selección en placas que contenían 150 µg/ml de Zeocin. Una transformación que usa el plásmido linealizado proporcionó varios cientos de transformantes.

Para ensayar en los clones de levadura recombinantes la expresión de QC, se cultivaron recombinantes durante 24 h en tubos cónicos de 10 ml que contenían 2 ml de BMGY. Después de ello, se centrifugó la levadura y se resuspendió en 2 ml de BMMY que contenía 0,5% de metanol. Se mantuvo esta concentración mediante la adición de metanol cada 24 h hasta las 72 h. Posteriormente, se determinó la actividad de QC en el sobrenadante. Se confirmó la presencia de la proteína de fusión mediante análisis de transferencia Western usando un anticuerpo dirigido contra el marcaje 6 x histidina (Qiagen). Se eligieron los clones que exhibían la mayor actividad de QC para experimentos adicionales y fermentación.

Expresión a gran escala en un fermentador

Se efectuó la expresión de QC en un reactor de 5 l (Biostat B, B. Braun biotech) esencialmente como se describe en "Pichia fermentation process guidelines"

(Invitrogen). Brevemente, se cultivaron las células en el medio de sales basales de fermentación suplementado con trazas de sales y con glicerol como única fuente de carbono (pH 5,5). Durante una fase de lote inicial durante
5 aproximadamente 24 h y una fase posterior alimentada por lotes durante aproximadamente 5 h se acumuló la masa celular. Una vez se alcanzó un peso húmedo celular de 200 g/l, se efectuó la inducción de la expresión de QC usando metanol y aplicando un perfil de alimentación de tres
10 etapas para un tiempo de fermentación total de aproximadamente 60 h. Posteriormente, se retiraron las células del sobrenadante que contenía QC mediante centrifugación a 6000 x g a 4°C durante 15 min. Se ajustó el pH a 6,8 mediante la adición de NaOH y se centrifugó de nuevo la disolución turbia resultante a 37.000 x g, 4°C,
15 durante 40 min. En caso de turbidez continua, se aplicó una etapa de filtración adicional usando una membrana de celulosa (anchura de poro 0,45 µm).

Purificación de QC marcada con 6 x histidina expresada en
20 *P. pastoris*

Se purificó en primer lugar la QC marcada con His mediante cromatografía de afinidad por metal inmovilizado (IMAC). En una purificación típica, se aplicaron 1000 ml de sobrenadante de cultivo a una columna Chelating Sepharose
25 FF cargada con Ni²⁺ (1,6 x 20 cm, Pharmacia), que se equilibró con tampón fosfato 50 mM, pH 6,8, que contenía NaCl 750 mM, a un caudal de 5 ml/min. Después de lavar con 10 volúmenes de columna de tampón de equilibrado y 5 volúmenes de columna de tampón de equilibrado que contenía
30 histidina 5 mM, se eluyó la proteína unida mediante desplazamiento a tampón fosfato 50 mM, pH 6,8, que contenía NaCl 150 mM e histidina 100 mM. Se dializó el eluido resultante frente a Bis-Tris/HCl 20 mM, pH 6,8, a 4°C durante una noche. Posteriormente, se purificó
35 adicionalmente la QC mediante cromatografía de intercambio aniónico en una columna Mono Q6 (BioRad), equilibrada con tampón de diálisis. Se cargó la fracción que contenía QC en

la columna usando un caudal de 4 ml/min. Se lavó entonces la columna con tampón de equilibrado que contenía NaCl 100 mM. Se efectuó la dilución mediante dos gradientes dando como resultado un tampón de equilibrado que contenía NaCl
5 240 mM y 360 mM en 30 ó 5 volúmenes de columna, respectivamente. Se recogieron fracciones de 6 ml y se analizó la pureza mediante PAGE-SDS. Se combinaron las fracciones que contenían QC homogénea y se concentraron mediante ultrafiltración. Para almacenamiento a largo plazo
10 (-20°C), se añadió glicerol a una concentración final del 50%. Se cuantificó la proteína según los procedimientos de Bradford o Gill y von Hippel (Bradford, M. M. 1976 Anal. Biochem. 72, 248-254; Gill, S. C. y von Hippel, P. H. 1989 Anal. Biochem. 182, 319-326).

15 Expresión y purificación de QC en E. coli

Se transformó el constructo que codifica QC en células M15 (Qiagen) y se cultivó en placas de agar LB selectivo a 37°C. Se llevó a cabo la expresión de proteína en medio LB que contenía 1% de glucosa y 1% de etanol a temperatura
20 ambiente. Cuando el cultivo alcanzó una DO₆₀₀ de aproximadamente 0,8, se indujo la expresión con IPTG 0,1 mM durante una noche. Después de un ciclo de congelación y descongelación, se lisaron las células a 4°C mediante la adición de lisozima 2,5 mg/ml en tampón fosfato 50 mM, pH
25 8,0, que contenía NaCl 300 mM e histidina 2 mM durante aproximadamente 30 min. Se clarificó la disolución mediante centrifugación a 37000 x g, 4°C, durante 30 min, seguido de una filtración aplicando una frita de vidrio (separación de ADN) y dos etapas de filtración adicionales aplicando
30 filtros de celulosa para precipitados gruesos y finos. Se aplicó el sobrenadante (aprox. 500 ml) sobre una columna de afinidad de Ni²⁺ (1,6 x 20 cm) a un caudal de 1 ml/min. Se llevó a cabo la elución de QC con tampón fosfato 50 mM que contenía NaCl 150 mM e histidina 100 mM. Se concentró la
35 fracción que contenía QC mediante ultrafiltración.

Purificación de QC de látex de papaya

Se preparó QC a partir de látex de papaya usando

BioCAD 700E (Perseptive Biosystems, Wiesbaden, Alemania) con una versión modificada de un procedimiento notificado anteriormente (Zerhouni, S. y col. 1989 Biochim. Biophys. Acta 138, 275-290). Se disolvieron 50 g de látex en agua y se centrifugaron como se describe en el mismo. Se efectuó la inactivación de las proteasas con metanotiosulfonato de S-metilo y se dializó el extracto bruto resultante. Después de diálisis, se cargó todo el sobrenadante en una columna SP Sepharose Fast Flor (21 x 2,5 cm d.i.), equilibrada con tampón acetato de sodio 100 mM, pH 5,0 (caudal 3 ml/min). Se efectuó la elución en tres etapas aumentando la concentración de tampón acetato de sodio a un caudal de 2 ml/min. La primera etapa era un gradiente lineal de tampón acetato de 0,1 a 0,5 M en 0,5 volúmenes de columna. La segunda etapa era un aumento lineal de la concentración de tampón de 0,5 a 0,68 M en cuatro volúmenes de columna. Durante la última etapa de elución, se aplicó un volumen de columna de tampón 0,85 M. Se combinaron las fracciones (6 ml) que contenían la mayor actividad enzimática. Se efectuaron los cambios de concentración y tampón a Tris/HCl 0,02 M, pH 8,0, mediante ultrafiltración (Amicon; corte de masa molecular de la membrana 10 kDa).

Se añadió sulfato de amonio a la enzima de papaya concentrada, obtenida a partir de la etapa de cromatografía de intercambio iónico a una concentración final 2 M. Se aplicó esta disolución a una columna Butyl Sepharose 4 Fast Flow (21 x 2,5 cm de d.i.) (caudal 1,3 ml/min), equilibrada con sulfato de amonio 2 M, Tris/HCl 0,02 M, pH 8,0. Se efectuó la elución en tres etapas con concentraciones decrecientes de sulfato de amonio. Durante la primera etapa, se aplicó un gradiente lineal de sulfato de amonio 2 a 0,6 M, Tris/HCl 0,02 M, pH 8,0, para 0,5 volúmenes de columna a un caudal de 1,3 ml/min. La segunda etapa era un gradiente lineal de sulfato de amonio 0,6 a 0 M, Tris/HCl 0,02 M, pH 8,0, en 5 volúmenes de columna a un caudal de 1,5 ml/min. Se llevó a cabo la última etapa de elución aplicando Tris/HCl 0,02 M a pH 8,0 para 2 volúmenes de

columna a un caudal de 1,5 ml/min. Se combinaron todas las fracciones que contenían actividad de QC y se concentraron mediante ultrafiltración. Se almacenó la QC homogénea resultante a -70°C. Se determinaron las concentraciones de proteína final usando el procedimiento de Bradford, comparadas con una curva patrón obtenida con seroalbúmina bovina.

Ejemplo 2: Ensayos de actividad glutaminil ciclase

Ensayos fluorimétricos

Se efectuaron todas las medidas con un lector BioAssay HTS-7000Plus para microplacas (Perkin Elmer) a 30°C. Se evaluó fluorimétricamente la actividad de QC usando H-Gln-βNA. Las muestras consistían en sustrato fluorigénico 0,2 mM, 0,25 U de piroglutamil aminopeptidasa (Unizyme, Hørsholm, Dinamarca) en Tris/HCl 0,2 M, pH 8,0, que contenía EDTA 20 mM y una alícuota apropiadamente diluida de QC en un volumen final de 250 µl. Las longitudes de onda de excitación/emisión eran de 320/410 nm. Se iniciaron las reacciones de ensayo mediante la adición de glutaminil ciclase. Se determinó la actividad de QC a partir de una curva patrón de β-naftilamina en condiciones de ensayo. Se define una unidad como la cantidad de QC que cataliza la formación de 1 µmol de pGlu-βNa a partir de H-Gln-βNA por minuto en las condiciones descritas.

En un segundo ensayo fluorimétrico, se determinó la actividad de QC usando H-Gln-AMC como sustrato. Se llevaron a cabo las reacciones a 30°C utilizando el lector NOVOSTar para microplacas (BMG labtechnologies). Las muestras consistían en concentraciones variables del sustrato fluorigénico, 0,1 U de piroglutamil aminopeptidasa (Qiagen) en Tris/HCl 0,05 M, pH 8,0, que contenía EDTA 5 mM y una alícuota apropiadamente diluida de QC en un volumen final de 250 µl. Las longitudes de onda de excitación/emisión eran de 380/460 nm. Se iniciaron las reacciones de ensayo mediante la adición de glutaminil ciclase. Se determinó la actividad de QC a partir de una curva patrón de 7-amino-4-metilcumarina en las condiciones de ensayo. Se evaluaron

los datos cinéticos usando el software GraFit.

Ensayo espectrofotométrico de QC

Se usó este ensayo novedoso para determinar los parámetros cinéticos de la mayoría de sustratos de QC. Se
5 analizó espectrofotométricamente la actividad de QC usando un procedimiento continuo, que se derivó adaptando un ensayo discontinuo previo (Bateman, R. C. J. 1989 J. Neurosci. Methods 30, 23-28) que utilizaba glutamato deshidrogenasa como enzima auxiliar. Las muestras
10 consistían en el sustrato de QC respectivo, NADH 0,3 mM, ácido α -cetoglutarico 14 mM y 30 U/ml de glutamato deshidrogenasa en un volumen final de 250 μ l. Se iniciaron las reacciones mediante la adición de QC y se siguieron controlando la reducción de absorbancia a 340 nm durante 8-
15 15 min. Se presentan en la Figura 1 los cursos temporales típicos de formación de producto.

Se evaluaron las velocidades iniciales y se determinó la actividad enzimática a partir de una curva patrón de amoniaco en condiciones de ensayo. Se midieron todas las
20 muestras a 30°C, usando el lector de microplacas SPECTRAFluor Plus o Sunrise (ambos de TECAN). Se evaluaron los datos cinéticos usando el software GraFit.

Ensayo de inhibidor

Para el ensayo de inhibidor, la composición de muestra
25 era la misma que se describe anteriormente, excepto por el presunto compuesto inhibidor añadido. Para un ensayo rápido de inhibición de QC, las muestras contenían 4 mM del inhibidor respectivo y una concentración de sustrato 1 K_M . Para investigaciones detalladas de la inhibición y
30 determinación de los valores de K_i , se investigó primero la influencia del inhibidor sobre las enzimas auxiliares. En cualquier caso, no se detectó influencia sobre ninguna enzima, posibilitando así la determinación fiable de la inhibición de QC. Se evaluó la constante de inhibición
35 ajustando el conjunto de curvas de progresión a la ecuación general para inhibición competitiva usando el software GraFit.

Ejemplo 3: Espectrometría de masas MALDI-TOF

Se llevó a cabo la espectrometría de masas por desorción/ionización mediante láser asistida por matriz usando el sistema Hewlett-Packard G2025 LD-TOF con un
5 analizador de tiempo de vuelo lineal. El instrumento estaba equipado con un láser de nitrógeno de 337 nm, una fuente de aceleración potencial (5 kV) y un tubo de 1,0 m de vuelo. La operación del detector estaba en modo de ión positivo y se registraron y filtraron las señales usando un
10 osciloscopio de almacenamiento digital LeCroy 9350M ligado a un ordenador personal. Se mezclaron las muestras (5 µl) con volúmenes iguales de disolución de matriz. Para la disolución de matriz, se usó DHAP/DAHC, preparado disolviendo 30 mg de 2',6'-dihidroxiacetofenona (Aldrich) y
15 44 mg de hidrogenocitrato de diamonio (Fluka) en 1 ml de acetonitrilo/0,1% de TFA en agua (1/1, v/v). Se transfirió un pequeño volumen (= 1 µl) de mezcla de matriz-analito a una punta de muestreo y se evaporó inmediatamente en una cámara de vacío (accesorio de preparación de muestras
20 Hewlett-Packard G2024A) para asegurar una cristalización de muestra rápida y homogénea.

Para ensayo a largo plazo de la ciclación de Glu¹, se incubaron péptidos derivados de Aβ en 100 µl de tampón acetato de sodio 0,1 M, pH 5,2, o tampón Bis-Tris 0,1 M, pH
25 6,5, a 30°C. Se aplicaron los péptidos a concentraciones de 0,5 mM [Aβ3-11a] o 0,15 mM [Aβ3-21a] y se añadieron 0,2 U de QC cada 24 horas. En el caso de Aβ3-21a, los ensayos contenían 1% de DMSO. Se retiraron en momentos diferentes muestras del tubo de ensayo, se extrajeron los péptidos
30 usando ZipTips (Millipore) según las recomendaciones del fabricante, se mezclaron con disolución de matriz (1:1 v/v) y posteriormente se registraron los espectros de masas. Los controles negativos no contenían QC o contenían enzima desactivada térmicamente. Para los estudios de inhibidor,
35 la composición de muestra era la misma descrita anteriormente, con excepción del compuesto inhibidor añadido (bencimidazol 5 mM o 1,10-fenantrolina 2 mM).

Ejemplo 4: Dependencia del pH

Se investigó la dependencia del pH de la catálisis de QC humana y de papaya en condiciones de reacción de primer orden, reflejando así el impacto de la concentración de protones sobre la constante de especificidad k_{cat}/K_M . Con este fin, se usó el ensayo enzimático acoplado que usa piroglutamil aminopeptidasa como enzima auxiliar y Gln- β NA como sustrato. Se mostró que la piroglutamil aminopeptidasa era activa y estable entre pH 5,5-8,5 (Tsuru, D. y col. 1978 J. Biochem. (Tokyo) 84, 467-476). Por tanto, el ensayo posibilitó el estudio de la catálisis de QC en esta región de pH. Los perfiles de velocidad obtenidos se ajustaron a curvas en forma de campana clásicas, como se muestra en la Figura 2. La QC humana posee una dependencia de pH muy estrecha con un óptimo aproximadamente a pH 7,8-8,0. La velocidad tendía a reducirse a pH más básico. Esto está en contraposición con el perfil de velocidad observado con QC de papaya, que no mostró caída de actividad hasta pH 8,5 (Figura 2, inserto). Sin embargo, ambas enzimas tenían su óptimo de especificidad a pH 8. Sorprendentemente, la evaluación de las curvas reveló valores de pKa idénticos en el intervalo ácido de $7,17 \pm 0,02$ y $7,15 \pm 0,02$ para QC humana y de papaya, respectivamente.

La reducción de la actividad de QC humana a valores de pH básicos era obviamente debida a la disociación de un grupo con un pKa de aproximadamente 8,5. En el caso de QC de papaya, no había una recogida excesiva de puntos de datos en el intervalo de pH básico que posibilitara una determinación fiable del segundo valor de pKa. Esto está apoyado por el ajuste de los datos a un modelo de disociación simple, que da como resultado un valor de pKa casi idéntico ($pK_a 7,13 \pm 0,03$) en comparación con el ajuste de los datos a un modelo de disociación doble. Esto indica que ambos valores de pKa están bastante separados.

Estabilidad al pH

Se investigó la estabilidad de las glutaminil ciclasas incubando las enzimas de planta y animal a 30°C durante 30

min a diferentes valores de pH entre pH 4-10. Después de ello, se determinó la actividad de QC en condiciones estándar. Se muestran los resultados en la Figura 3.

La QC de látex de papaya era estable en el intervalo de pH estudiado, sin una tendencia obvia a inestabilidad en el intervalo ácido o básico. En contraposición, la QC humana mostró sólo una estabilidad comparable en el intervalo de pH entre 7 y 8,5, exhibiendo una notable inestabilidad a valores de pH por encima de pH 8,5 y por debajo de pH 6. Por tanto, la región alrededor de pH 8 parece ser óptima para QC de planta y humana y un valor de pH adecuado para efectuar una comparación de especificidad de sustrato de las QC.

Ejemplo 5: Determinación de la especificidad de sustrato de QC

Ensayo espectrofotométrico

Se efectuó el ensayo espectrofotométrico continuo como se describe en el ejemplo 2. En consecuencia, la actividad de QC se refleja por una reducción de la absorbancia a 340 nm causada por la liberación de amoníaco y el posterior consumo de NADH/H⁺ debido a la formación de glutamato a partir de ácido α -glutárico. Como se muestra en la Figura 1, se controlaron las curvas de progresión lineales y había una relación lineal entre la actividad medida y la concentración de QC. Además, los parámetros cinéticos obtenidos para H-Gln-Gln-OH usando el ensayo continuo presentado aquí (Tabla 1) estaban bien de acuerdo con los obtenidos usando el procedimiento discontinuo ($K_M = 175 \pm 18 \mu M$, $k_{cat} = 21,3 \pm 0,6 s^{-1}$). Además, los parámetros cinéticos para la conversión de los sustratos H-Gln-Ala-OH, H-Gln-Glu-OH, H-Gln-Gln-OH, H-Gln-OtBu y H-Gln-NH₂ por QC de papaya mostrados en la Tabla 1 se corresponden bien con los determinados usando un procedimiento directo a pH 8,8 y 37°C (Gololobov, M. Y. y col. 1996 Biol. Chem. Hoppe Seyler 377, 395-398). Por tanto, es bastante obvio que el ensayo continuo novedoso proporciona resultados fiables.

Análogos di-, tri- y dipeptídicos

Utilizando el ensayo continuo novedoso descrito anteriormente, se ensayaron aproximadamente 30 compuestos como sustratos potenciales de QC de *C. papaya* y humana. Se exhiben los resultados en la Tabla 5. Por comparación de las especificidades, se mostró que casi todos los sustratos peptídicos cortos se convierten más eficazmente por QC de papaya en comparación con la enzima humana. De forma interesante, para ambas enzimas, los sustratos con grandes residuos hidrófobos en la segunda posición son los más potentes, como se muestra por las especificidades de H-Gln-Tyr-Ala-OH, H-Gln-Phe-Ala-NH₂ y H-Gln-Trp-Ala-NH₂ en comparación con las de otros tripéptidos o por las reactividades de los sustratos cromóforos H-Gln-AMC, H-Gln-βNA y H-Gln-Tyr-OH en comparación con sustratos dipeptídicos. Para QC de papaya, este hallazgo está de acuerdo con resultados anteriores que muestran que la especificidad está correlacionada con el tamaño del segundo residuo aminoacídico (Gololobov, M. Y. y col. 1996 Biol. Chem. Hoppe Seyler 377, 395-398). La única diferencia destacable de especificidad de la QC de planta y animal se observó en el caso de H-Gln-OtBu. Mientras que el éster se convirtió por QC de papaya con especificidad similar comparada con sustratos dipeptídicos, se convirtió aproximadamente un orden de magnitud más lentamente por QC humana.

Oligopéptidos

Además de varios dipéptidos y tripéptidos, se ensayó en una serie de oligopéptidos la conversión por QC de papaya y humana (Tabla 5). De forma interesante, la diferencia global en las especificidades entre QC humana y de planta para un conjunto de tetrapéptidos no era tan grande como la observada para sustratos dipeptídicos y tripeptídicos. Esto indica que los aminoácidos en la posición 3^a y 4^a siguen afectando al comportamiento cinético, especialmente de QC humana. Sin embargo, una excepción comprende los péptidos con un residuo de prolina en la segunda posición aminoacídica, que muestran valores

de k_{cat}/K_M destacadamente reducidos en un conjunto de tetrapéptidos de estructura H-Gln-Xaa-Tyr-Phe-NH₂ (Tabla 5). La reducción de especificidad era más marcada para QC humana, conduciendo a una diferencia de aproximadamente 8 veces en el valor de k_{cat}/K_M en comparación con la QC de papaya.

Se observaron también especificidades ligeramente reducidas de la QC humana para la conversión de sustratos con un aminoácido C-terminal glutamina cargado positivamente, como se indica por las especificidades de H-Gln-Arg-Tyr-Phe-NH₂, H-Gln-Arg-Tyr-Phe-NH₂ y H-Gln-Lys-Arg-Leu-NH₂ en comparación con otros tetrapéptidos. Aparentemente, la especificidad reducida era debida principalmente a un menor número de recambio. No era el caso de este efecto para la enzima de planta.

Tabla 5: Evaluación cinética de sustratos peptídicos de QC humana y de papaya (n.r., no reactivo; n.i., sin inhibición; n.d., no determinado; *, para inhibición de sustrato)

Sustrato	QC humana				QC de papaya			
	K_M (μM)	k_{cat} (s^{-1})	K_i^* (mM)	k_{cat}/K_M ($\text{mM}^{-1} \text{s}^{-1}$)	K_M (μM)	k_{cat} (s^{-1})	K_i^* (mM)	k_{cat}/K_M ($\text{mM}^{-1} \text{s}^{-1}$)
H-Gln-OH	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.d.	n.d.	n.d.	0,23 $\pm$ 0,1
H-Gln-AMC	54 $\pm$ 2	5,3 $\pm$ 0,1	n.d.	98 $\pm$ 2	42 $\pm$ 1	39,4 $\pm$ 0,4	n.d.	938 $\pm$ 13
H-Gln- β NA	70 $\pm$ 3	20,6 $\pm$ 0,5	1,21 $\pm$ 0,07	294 $\pm$ 6	38 $\pm$ 3	51,4 $\pm$ 1,4	1,20 $\pm$ 0,08	1353 $\pm$ 70
H-Gln-OtBu	1235 $\pm$ 74	6,7 $\pm$ 0,2	n.i.	5,4 $\pm$ 0,2	223 $\pm$ 9	49,4 $\pm$ 0,6	n.i.	222 $\pm$ 6

H-Gln-NH ₂	409 ±40	12,8 ±0,5	n.i.	31 ±2	433 ±13	44,8 ±0,4	n.i.	103±2
H-Gln-Gly-OH	247 ±10	13,2 ±0,2	n.i.	53 ±1	641 ±20	45,8 ±0,4	n.i.	71 ±2
H-Gln-Ala-OH	232 ±5	57,2 ±0,4	n.i.	247 ±4	158 ±8	69,8 ±1,0	n.i.	442 ±16
H-Gln-Gln-OH	148 ±5	20,7 ±0,2	n.i.	140 ±2	44 ±3	43,2 ±0,7	n.i.	982 ±51
H-Gln-Glu-OH	359 ±10	24,7 ±0,2	n.i.	58 ±1	106 ±5	50,3±0,6	n.i.	475 ±17
H-Gln-Val-OH	196 ±5	17,2 ±0,1	n.i.	88 ±2	n.d.	n.d.	n.i.	n.d.
H-Gln-Tyr-OH	211 ±5	94 ±1	n.i.	446±6	n.d.	n.d.	n.i.	n.d.
H-Gln-Glu-Tyr-NH ₂	79 ±2	45,1 ±0,4	n.i.	524±8	103 ±4	53,6 ±0,7	n.i.	520 ±13
H-Gln-Gly-Pro-OH	130 ±5	25,3 ±0,2	n.i.	195 ±7	333 ±15	41,7 ±0,5	n.i.	125 ±4
H-Gln-Tyr-Ala-OH	101 ±4	125 ±1	n.i.	930 ±27	63 ±3	104,0 ±1,0	n.i.	1650 ±63
H-Gln-Phe-Ala-NH ₂	69 ±3	109 ±1	n.i.	1811 ±54	111 ±5	132,1 ±0,6	n.i.	1190 ±48
H-Gln-Trp-Ala-NH ₂	50 ±2	47,0 ±0,7	n.i.	940 ±24	78 ±5	151,8 ±2,6	n.i.	1946 ±91
H-Gln-Arg-Gly-Ile-NH ₂	143 ±4	33,5 ±0,4	n.i.	234 ±4	123 ±10	49,2 ±1,7	n.i.	400 ±19
H-Gln-Asn-Gly-Ile-NH ₂	172 ±5	56,6 ±0,5	n.i.	329 ±7	153 ±9	51,4 ±0,9	n.i.	336 ±14
H-Gln-Ser-Tyr-Phe-NH ₂	55 ±3	52,8 ±0,8	n.i.	960 ±38	135 ±6	84,9 ±1,0	n.i.	481 ±14
H-Gln-Arg-Tyr-Phe-NH ₂	55 ±2	29,6 ±0,3	n.i.	538 ±14	124 ±6	48,9 ±0,7	n.i.	394 ±13
H-Gln-Pro-Tyr-Phe-NH ₂	1889 ±152	31,7 ±1,2	n.i.	17 ±1	149 ±14	18,8 ±0,6	n.i.	126 ±8
H-Gln-His-Tyr-Phe-NH ₂	68 ±3	55,4 ±0,7	n.i.	815 ±26	92 ±7	75,9 ±1,4	n.i.	825 ±48
H-Gln-Gln-Tyr-Phe-NH ₂	41 ±2	41,4 ±0,4	n.i.	1010 ±40	45 ±2	52,8 ±0,7	n.i.	1176 ±37
H-Gln-Glu-Tyr-Phe-NH ₂	47 ±4	46 ±1	n.i.	979 ±62	100 ±4	54,6 ±0,6	n.i.	546 ±16
H-Gln-Glu-Ala-Ala-NH ₂	77 ±4	46 ±1	n.i.	597 ±18	102 ±4	53,7 ±0,6	n.i.	526 ±15
H-Gln-Glu-Tyr-Ala-NH ₂	69 ±2	42,1 ±0,4	n.i.	610 ±12	113 ±5	44,7 ±0,5	n.i.	396 ±13
H-Gln-Glu-Ala-Phe-NH ₂	39 ±3	39 ±1	n.i.	1000 ±51	81 ±3	48,5 ±0,45	n.i.	599 ±17
H-Gln-Glu-Asp-Leu-NH ₂	55 ±2	45,8 ±0,5	n.i.	833 ±21	107 ±6	58,5 ±0,4	n.i.	547 ±27
H-Gln-Lys-Arg-Leu-NH ₂	54 ±3	33,4 ±0,5	n.i.	619 ±25	118 ±6	48,2 ±0,8	n.i.	408 ±14

Los resultados obtenidos con los tetrapéptidos dan lugar también a otra conclusión. Como ya se apuntó, la QC de papaya mostraba una mayor selectividad por dipéptidos.

5 Para algunos de los tetrapéptidos, sin embargo, se observaron constantes de especificidad mayores con QC humana, como se muestra en la Figura 4 que proporciona una representación de los datos dados en la Tabla 5 para un conjunto de péptidos que contenían glutamato en la segunda

10 posición aminoacídica. Además, a medida que aumenta la longitud de cadena de di- a tetrapéptidos, aumenta la selectividad de la QC humana, en contraposición con los resultados obtenidos con QC de papaya. Adicionalmente, se registró la mayor selectividad de QC humana para los

15 péptidos que contenían residuos hidrófobos voluminosos en la posición aminoacídica 3^a y 4^a, lo que indica interacciones hidrófobas con la enzima. Por comparación de los parámetros cinéticos de los péptidos respectivos, los cambios parecen ser debidos principalmente a valores

20 menores de K_M , encontrándose que los números de recambio para la conversión de los péptidos eran similares. Por

tanto, la mayor selectividad de la QC humana por péptidos más largos se considera que es el resultado de una unión más estrecha de los sustratos más hidrófobos a la enzima.

Las diferencias entre QC humana y de planta observadas con péptidos que contienen aminoácidos hidrófobos en la posición 3^a y 4^a resultan también evidentes por comparación de las constantes de especificidad de las enzimas hacia H-Gln-Arg-Gly-Ile-NH₂ y H-Gln-Arg-Tyr-Phe-NH₂ o H-Gln-Gln-OH y H-Gln-Gln-Tyr-Phe-OH.

Se encontró también que la QC humana era más selectiva por sustratos homólogos que contienen Gln N-terminal y un número creciente de residuos de Ala C-terminales (Tabla 6). Aunque la selectividad de la QC humana aumentaba con la longitud del sustrato, no había dicha tendencia con la QC de papaya. Puesto que la QC humana era menos específica de un péptido que contenía un residuo de Ser en la secuencia, también la naturaleza de la cadena lateral parece ser de importancia (tabla 6).

Tabla 6: Influencia de la longitud de sustrato sobre la actividad de QC humana y de papaya

Sustrato	QC humana			QC de papaya		
	K_M (μ M)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_M ($mM^{-1} s^{-1}$)	K_M (μ M)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_M ($mM^{-1} s^{-1}$)
H-Gln-Ala-NH ₂	155 $\pm$ 9	40,1 $\pm$ 0,9	259 $\pm$ 9	212 $\pm$ 21	62,8 $\pm$ 3,0	296 $\pm$ 15
H-Gln-Ala-Ala-NH ₂	87 $\pm$ 3	76,3 $\pm$ 0,7	877 $\pm$ 22	164 $\pm$ 6	83,2 $\pm$ 1,0	507 $\pm$ 12
H-Gln-Ala-Ala-Ala-NH ₂	65 $\pm$ 3	60,5 $\pm$ 0,7	1174 $\pm$ 43	197 $\pm$ 8	74,6 $\pm$ 1,0	379 $\pm$ 10
H-Gln-Ala-Ala-Ser-Ala-NH ₂	79 $\pm$ 6	55,3 $\pm$ 1,6	700 $\pm$ 33	216 $\pm$ 6	78,5 $\pm$ 1,0	363 $\pm$ 15

Influencia de la fuerza iónica sobre la catálisis

Otro parámetro que se investigó respecto a su influencia sobre la especificidad de sustrato fue la fuerza iónica. Con ese fin, se determinaron los parámetros cinéticos de ciclación de varios sustratos en presencia o ausencia de KCl 0,5 M (Tabla 7). Sorprendentemente, la selectividad por sustratos de cadena principal no cargada no cambiaba significativamente por la adición de sal en el caso de QC de látex de papaya y QC humana. Sin embargo, las constantes de especificidad de la QC humana por H-Gln-Ala-OH y H-Gln-Glu-OH se redujeron mediante la adición de KCl. Como se indica por los parámetros cinéticos individuales,

este efecto era debido a una K_M creciente y un valor de k_{cat} sólo ligeramente decreciente. En el caso de QC de papaya, no había efecto sobre ningún parámetro detectado. El efecto parecía ser debido no sólo al sustrato cargado negativamente como tal, puesto que se encontraron parámetros sin cambios para el péptido cargado negativamente H-Gln-Glu-Asp-Leu-NH₂. Se encontró un efecto interesante de la adición de sal para los sustratos cargados positivamente H-Gln-Arg-Gly-Ile-NH₂ y H-Gln-Lys-Arg-Leu-NH₂. En el caso de QC de planta y humana, se determinó un efecto positivo sobre la catálisis principalmente debido a un valor de K_M menor y un número de recambio ligeramente mayor.

Tabla 7: Influencia de la fuerza iónica sobre la catálisis de QC humana y de papaya

	Sustrato	Tricina-NaOH 0,05 M, pH 8,0				Tricina-NaOH 0,05 M, pH 8,0, KCl 0,5 M			
		K_M (mM)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_M (mM ⁻¹ s ⁻¹)	K_i (mM)	K_M (mM)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_M (mM ⁻¹ s ⁻¹)	K_i (mM)
QC de papaya	H-Gln-NH ₂	0,434 ±0,015	43,4 ±0,4	100 ±3	n.l.	0,446 ±0,010	45,2 ±0,3	101 ±2	n.l.
	H-Gln-βNA	0,036 ±0,002	48,8 ±1,0	1356 ±50	1,14 ±0,05	0,032 ±0,002	47,2 ±0,8	1475 ±70	1,33 ±0,07
	H-Gln-Ala-OH	0,137 ±0,007	69,7 ±,9	509 ±19	n.l.	0,143 ±0,005	68,1 ±0,6	480 ±12	n.l.
	H-Gln-Glu-OH	0,098 ±0,005	45,0 ±0,5	459 ±18	n.l.	0,094 ±0,003	44,4 ±0,3	472 ±12	n.l.
	H-Gln-Trp-Ala-NH ₂	0,079 ±0,005	138 ±3	1747 ±73	n.l.	0,072 ±0,004	133 ±3	1847 ±61	n.l.
	H-Gln-Arg-Gly-Ile-NH ₂	0,106 ±0,008	52,9 ±1,2	499 ±26	n.l.	0,065 ±0,005	48,4 ±1,0	745 ±42	n.l.
	H-Gln-Lys-Arg-Leu-NH ₂	0,102 ±0,007	50 ±1	493 ±22	n.l.	0,053 ±0,002	58,1 ±0,7	1096 ±28	n.l.
	H-Gln-Glu-Asp-Leu-NH ₂	0,109 ±0,005	52,4 ±0,7	481 ±16	n.l.	0,094 ±0,003	53,6 ±0,5	570 ±13	n.l.

	Sustrato	Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0				Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0, KCl 0,5 M			
		K_M (mM)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_M (mM ⁻¹ s ⁻¹)	K_i (mM)	K_M (mM)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_M (mM ⁻¹ s ⁻¹)	K_i (mM)
QC humana	H-Gln-NH ₂	0,442 ±0,030	12,8 ±0,3	29 ±1	n.l.	0,401 ±0,014	12,2 ±0,1	30 ±1	n.l.
	H-Gln-βNA	0,076 ±0,004	21,7 ±0,5	285 ±8	1,39 ±0,08	0,063 ±0,003	20,0 ±0,4	318 ±9	0,97 ±0,04
	H-Gln-Ala-OH	0,289 ±0,007	54,4 ±0,5	202 ±3	n.l.	0,357 ±0,012	47,6 ±0,8	133 ±3	n.l.
	H-Gln-Glu-OH	0,373 ±0,015	21,4 ±0,3	57 ±2	n.l.	0,607 ±0,036	18,9 ±0,5	31 ±1	n.l.
	H-Gln-Trp-Ala-NH ₂	0,054 ±0,003	50,8 ±0,6	941 ±41	n.l.	0,056 ±0,002	50,0 ±0,4	893 ±25	n.l.
	H-Gln-Arg-Gly-Ile-NH ₂	0,166 ±0,013	31 ±1	187 ±9	n.l.	0,091 ±0,005	29,8 ±0,5	327 ±12	n.l.
	H-Gln-Lys-Arg-Leu-NH ₂	0,051 ±0,003	29,4 ±0,5	577 ±24	n.l.	0,034 ±0,001	31,6 ±0,3	929 ±19	n.l.
	H-Gln-Glu-Asp-Leu-NH ₂	0,060 ±0,002	46,6 ±0,5	777 ±18	n.l.	0,061 ±0,002	45,6 ±0,5	748 ±16	n.l.

Sustratos fisiológicos

En estudios previos, se ha mostrado ya la conversión de [Gln¹]-TRH y [Gln¹]-GnRH por QC para QC de pituitaria

bovina y porcina (Busby, W. H. J. y col. 1987 J. Biol. Chem. 262, 8532-8536; Fischer, W. H. y Spiess, J. 1987 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 3628-3632). Además de estas hormonas de pituitaria ya investigadas, se sintetizaron tres sustratos fisiológicos potenciales de QC humana y se ensayó su conversión, a saber [Gln¹]gastrina, [Gln¹]neurotensina y [Gln¹]FPP. Se enumeran los parámetros cinéticos para su conversión en la Tabla 1. De forma interesante, se convierten los péptidos de glutaminilo en los respectivos péptidos de piroglutamilo con constantes de especificidad crecientes dependientes de su tamaño, concretamente, primero el péptido mayor pro-gastrina de 17 aminoácidos, seguido de pro-neurotensina, pro-GnRH, pro-TRH y pro-FPP. Esos hallazgos corresponden a los datos obtenidos con los péptidos sintéticos.

Sorprendentemente, los sustratos más largos se convierten también con mayor selectividad por la enzima de planta, un resultado que contrasta en parte con los hallazgos para oligopéptidos más cortos. Posiblemente, haya interacciones de unión secundarias entre sustrato y enzima distantes del sitio activo.

Péptidos que comprenden aminoácidos modificados

Para investigar adicionalmente la especificidad y selectividad de las QC, se sintetizaron péptidos que comprendían un residuo de glutaminilo N-terminal modificado o un aminoácido modificado en la segunda posición. Se investigó cualitativamente la conversión de estos péptidos utilizando espectrometría de masas MALDI-TOF (véase también el ejemplo 3). Debido a la ciclación del residuo de glutaminilo o su análogo, respectivamente, se detecta una diferencia de masa de sustrato y producto de catálisis. En casos de liberación de amoniaco de un mol por mol de sustrato, se analizó cuantitativamente también la conversión usando el ensayo espectrofotométrico.

H-Gln-Lys(Gln)-Arg-Leu-Ala-NH₂. Se convirtió este péptido ramificado N-terminal, que comprende dos residuos de glutaminilo en el extremo N que están unidos a un

residuo de lisilo mediante un enlace peptídico y parcialmente isopeptídico, mediante QC humana (Figura 5) y de papaya (no mostrado) de manera aparentemente idéntica. Se convirtieron ambos residuos de glutaminilo en ácido piroglutámico, sin preferencia detectable por un residuo definido, como se indica por la conversión de sustrato consistente (Figura 5). Por tanto, la selectividad de las QC por los residuos de glutaminilo unidos diferentemente no difiere fundamentalmente.

10 *H-Gln(NMe)-Phe-Lys-Ala-Glu-NH₂*. Se convirtió el residuo de glutaminilo metilado en un residuo de piroglutamilo sólo por la QC de papaya (Figura 6). Adicionalmente, no se detectó una inhibición de la QC humana por el péptido, indicando que el residuo metilado no se reconoce por QC humana.

15 *H-Glu(OMe)-βNA* y *H-Glu-βNA*. Ninguno de estos compuestos se convirtió por QC de papaya ni humana. Se analizaron fluorimétricamente estos sustratos fluorogénicos utilizando piroglutamil aminopeptidasa como enzima auxiliar. Sin embargo, el residuo de glutamato O-metilado mostraba una notable inestabilidad en ambos, tendiendo los tampones Tris y Tricina a una ciclación catalizada no enzimáticamente. Además, la actividad de ambas QC contra *H-Gln-AMC* como sustrato no se inhibió por los péptidos más largos *H-Glu(OMe)-Phe-Lys-Arg-Leu-Ala-NH₂* o *H-Glu-Phe-Lys-Arg-Leu-Ala-NH₂*, indicando que ni el ácido glutámico ni los derivados son reconocidos por ambas formas de QC. Además, el resultado implica que no sólo la carga negativa del residuo de ácido glutámico es la razón de la repulsión del péptido del sitio activo.

30 *H-Gln-ciclo(Nε-Lys-Arg-Pro-Ala-Gly-Phe)*. Se analizó cuantitativamente la conversión de *H-Gln-ciclo(Nε-Lys-Arg-Pro-Ala-Gly-Phe)*, que contiene un enlace isopeptídico intramolecular parcial, revelando valores de K_M de 240 ± 14 μM y 133 ± 5 μM para QC humana y de papaya, respectivamente. Debido al mayor número de recambio de la conversión por QC de papaya ($49,4 \pm 0,6$ s^{-1}) en comparación

con QC humana ($22,8 \pm 0,6 \text{ s}^{-1}$), la enzima de planta exhibe con $372 \pm 9 \text{ mM}^{-1}\text{min}^{-1}$ un valor de $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ aproximadamente 4 veces mayor que la QC humana. Por tanto, la constante de especificidad es en el caso de la QC de papaya sólo
5 ligeramente menor comparada con los sustratos que tienen un tamaño similar tales como H-Gln-Ala-Ala-Ser-Ala-Ala-NH₂. Sin embargo, se encontró que el valor de $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ para QC humana era con $95 \pm 3 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ aproximadamente un orden de magnitud menor en comparación con sustratos de tamaño
10 similar (Tabla 5).

H-βhomoGln-Phe-Lys-Arg-Leu-Ala-NH₂. Se convirtió el residuo de β-homoglutaminilo N-terminal en un anillo de lactama de cinco miembros mediante catálisis de QC humana y de papaya, respectivamente. Se analizó
15 espectrofotométricamente la liberación simultánea de amoníaco y mediante análisis MALDI-TOF como se describe antes. No se detectó liberación de amoníaco cuando se omitió o hirvió la QC, indicando una catálisis específica de la ciclación. De forma interesante, la QC de *C. papaya* ($K_{\text{M}} = 3,1 \pm 0,3 \text{ mM}$, $k_{\text{cat}} = 4,0 \pm 0,4 \text{ s}^{-1}$) y humana ($K_{\text{M}} = 2,5 \pm 0,2 \text{ mM}$, $k_{\text{cat}} = 3,5 \pm 0,1 \text{ s}^{-1}$) catalizan la conversión de este péptido con valores de $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ casi idénticos de $1,4 \pm 0,1$ y $1,3 \pm 0,1 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$, respectivamente. Por tanto, la ciclación del residuo de β-homoglutamina se cataliza con una eficacia
25 reducida aproximadamente 1000 veces comparada con péptidos de tamaño similar que contienen un residuo de glutaminilo en su extremo N. Esto muestra que la configuración del carbono α del sustrato es importante para el reconocimiento de sustrato por las formas de QC, pero no esencial. El requisito esencial para ser un sustrato es un grupo γ-amida y un grupo N-terminal no protonado con una distancia y ángulo apropiados para ciclación, un requisito que se satisface por residuos de glutaminilo y β-homoglutaminilo N-terminales.

35 **Ejemplo 6: Síntesis de sustratos de QC**

Oligopéptidos. Se sintetizaron semiautomáticamente péptidos a escala de 0,5 mmol usando un sintetizador

peptídico (Labortec SP650, Bachem, Suiza) como se describe anteriormente (Schilling, S. y col. 2002 Biochemistry 41, 10849-10857). Se sintetizaron péptidos más largos a escala de 25 µmol usando el sintetizador peptídico automatizado Symphony (Rainin Instrument Co.) como se ha descrito (Manhart, S. y col. 2003 Biochemistry 42, 3081-3088). Para todos los péptidos se emplearon protocolos de acoplamiento de Fmoc modificados de síntesis peptídica en fase sólida que usaban tetrafluoroborato de 2-(1*H*-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (TBTU; Novabiochem)/base (diisopropiletilamina o N-metilmorfolina; Merck) o, en el caso de acoplamientos difíciles, se usaron N-óxido de hexafluorofosfato de N-[(dimetilamino)-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]piridin-1-ilmetilen]-N-metilmetanaminio (4,5) (HATU; Applied Biosystems)/diisopropiletilamina como reactivos de activación. Después de la escisión de la resina por un cóctel que contenía ácido trifluoroacético (TFA; Merck), se purificaron los péptidos brutos mediante HPLC preparativa con disolventes exentos de ácido para evitar una ciclación adicional de la glutamina N-terminal. Se efectuó la HPLC preparativa con un gradiente lineal de acetonitrilo (Merck) en agua (5-40% o 65% de acetonitrilo durante 40 min) en una columna 250-21 Luna RP18 (Phenomenex). Para confirmar la pureza e identidad del péptido, se emplearon HPLC analítica y ESI-EM.

Glu(NH-NH₂)-Ser-Pro-Thr-Ala-NH₂. Se sintetizó el péptido precursor lineal (Fmoc-Glu-Ser-Pro-Thr-Ala-NH₂) según procedimientos de Fmoc estándar (Schilling, S. y col. 2002 Biochemistry 41, 10849-10857) en resina Rink de amida MBHA (Novabiochem). Después de la escisión del péptido protegido con Fmoc de la resina, se precipitó el péptido con dietiléter (Merck), se filtró y se secó. Se usó resina HMBA-AM (1,16 mmol/g, Novabiochem) para el acoplamiento del grupo ácido γ-carboxílico del ácido glutámico del péptido precursor (3 eq.) en diclorometano (DCM, Merck). Se usaron diciclohexilcarbodiimida (DCC, Serva) (4 eq.) y dimetilaminopiridina (DMAP, Aldrich) (0,1 eq.) como

reactivos de acoplamiento. Después de 12 horas, se filtró la resina, se lavó con DCM y se repitió la reacción. Después de la desprotección del grupo Fmoc N-terminal empleando 20% de piperidina en DMF (3 x 5 min), se trató la resina peptídica con una disolución de hidrazina al 5% (20 ml/g) durante 1,5 horas. Se filtró la resina y se lavó con dimetilformamida (DMF, Roth, Alemania) y TFA. Después de la evaporación, se precipitó el péptido bruto con éter, dando 76% de rendimiento.

10 *H-Gln-Lys(Gln)-Arg-Leu-Ala-NH₂*. Se sintetizó el péptido lineal según el procedimiento de Fmoc/Bu estándar en amida MBHA de Rink (Schilling, S. y col. 2002 Biochemistry 41, 10849-10857) usando Fmoc-Lys(Fmoc)-OH como penúltimo acoplamiento aminoacídico. Después de la desprotección de los dos grupos protectores de amino de lisina con 20% de piperidina (Merck) en DMF, se acoplaron 4 eq. de Fmoc-Gln(Trt)-OH. El procedimiento de escisión estándar dio como resultado un 95% de rendimiento.

20 *H-Gln(NMe)-Phe-Lys-Ala-Glu-NH₂*. Se sintetizó Fmoc-Gln(NMe)-OH partiendo de Fmoc-Glu-OtBu cargado en resina Fmoc-MI-AM (Novabiochem). Después de hinchar con DCM, se lavó la resina (0,5 g) con DMF y se desprotegió con una disolución de 20% de piperidina en DMF. Se añadió la resina a 5 ml de DMF y se añadieron simultáneamente 5 eq. de Fmoc-Glu-OtBu, 5 eq. de HATU y 10 eq. de DIPEA y se agitó durante 6 horas. Después de filtración y lavado, se escindió el producto según las condiciones de escisión con TFA estándar. Se sintetizó el péptido *H-Gln(NMe)-Phe-Lys-Ala-Glu-NH₂* como se ha descrito (Schilling, S. y col. 2002 Biochemistry 41, 10849-10857). Se acopló Fmoc-Gln(NMe)-OH con HATU/DIPEA durante una noche. El procedimiento de escisión estándar dio como resultado un 78% del péptido bruto.

35 *H-Glu(OMe)-β-naftilamida, H-Gln-Val-OH, H-Gln-Tyr-OH*. Se sintetizaron dipéptidos protegidos con Boc aplicando el procedimiento de anhídrido mixto estándar usando clorocarbonato de isobutilo (Merck). Se saponificaron los

ésteres metílicos C-terminales Boc-Gln-Tyr-OMe y Boc-Gln-Val-OMe con NaOH 1 N en dioxano. Se desprotegieron los péptidos protegidos con Boc mediante disolución de HCl/dioxano durante 10 min. Después de la evaporación, se cristalizó el residuo con varios disolventes dando 60-70% de un compuesto sólido.

H-Gln-ciclo(Nε-Lys-Arg-Pro-Ala-Gly-Phe). Se sintetizó el precursor lineal Boc-Gln(Trt)-Lys-Arg(Pmc)-Ala-Gly-Phe-OH en resina de 2-clorotritilo sensible a ácido. Se llevó a cabo el acoplamiento usando un protocolo estándar de la estrategia de Fmoc/Bu que usaba Fmoc-Lys(Mtt)-OH. Después de escisión con disolución de 3% de TFA en DCM (10 veces, 5 min), se neutralizó la disolución con 10% de piridina (Merck) en metanol (MeOH; Merck), se lavó 3 veces con DCM y MeOH, se evaporó al 5% del volumen y se precipitó el péptido bruto con agua enfriada con hielo. Después, se cicló el péptido bruto usando activación con DCC/N-hidroxibenzotriazol (HOBt; Aldrich). Se disolvió el péptido bruto en diclorometano seco (0,2 mmol)/50 ml) y se añadieron 0,2 mmol de N-metilmorfolina y 0,4 mmol de 1-hidroxibenzotriazol. Se añadió esta disolución gota a gota a una disolución de 0,4 mmol de diciclohexilcarbodiimida en 250 ml de diclorometano a 0°C. Se completó la reacción agitando durante una noche a temperatura ambiente. Después de la filtración de N,N'-diciclohexilurea, se retiró el disolvente por evaporación. Se disolvió el residuo en acetato de etilo y se lavó varias veces con HCl 1 N, disolución saturada de NaHCO₃ y agua. Se secó la disolución sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se evaporó hasta sequedad a vacío.

Ejemplo 7: Caracterización de efectores de QC

Derivados de imidazol

Se ensayaron derivados de imidazol y bencimidazol que portan sustituyentes en diferentes posiciones del anillo de 5 miembros como inhibidores de QC (Tabla 3). La numeración designa el anillo de imidazol. Los procedimientos aplicados son los descritos en el ejemplo 2.

Derivados de C-4(5) y C-4,5. Los compuestos que portaban sustituciones en las posiciones 4 ó 5 configuracionalmente equivalentes del anillo de imidazol o en ambas posiciones mostraron una potencia reducida de inhibición de QC humana. Sin embargo, la única excepción comprendía histamina N- ω -acetilada que probó ser uno de los compuestos inhibidores más potentes. Los sustituyentes pequeños en estas posiciones tenían sólo un bajo efecto sobre la unión como se indica por la constante de inhibición similar de 5-hidroximetil-4-metilimidazol comparada con imidazol. Los grupos más grandes y voluminosos unidos a estos sitios reducían o anulaban la unión del compuesto a la enzima. Algunos de los otros sustituyentes ensayados son conocidos por ejercer efectos inductivos o mesoméricos negativos que pueden reducir la densidad electrónica en el anillo de imidazol, lo que contribuye también a peores constantes de unión. La diferencia en los valores de K_i de L-histidina e histidinamida indica también cierta influencia de la carga sobre la unión. La evidencia de repulsión electrostática de los sustratos cargados se mostró ya en estudios de especificidad de sustrato, concretamente la glutaminamida se convertía fácilmente en productos por QC humana, pero no se observaba reactividad para glutamina libre como sustrato.

Derivados de C-2. Todos los derivados ensayados inhibían la QC más débilmente que el imidazol. Cualquier sustitución mayor de un protón impide la unión correcta de QC. Sólo debido al grupo metilo en 2-metibencimidazol, la constante de inhibición cae aproximadamente un orden de magnitud. Se mostró una relación muy similar por comparación de los valores de K_i para bencimidazol y 2-aminobencimidazol. Adicionalmente, los resultados indican que la influencia no está relacionada con alteraciones electrónicas.

Derivados de N-1. Entre los derivados de imidazol ensayados en la inhibición de QC humana, la mayoría de

compuestos que tenían valores de K_i mejorados en comparación con el imidazol mostraron alteraciones en un átomo de nitrógeno. Estos compuestos contenían también uno de los inhibidores de QC más eficaces, el 1-bencilimidazol.

5 De forma interesante, alteraciones muy pequeñas de esta estructura condujeron a una pérdida de la calidad inhibidora, como puede observarse para 1-benzoilimidazol y fenilimidazol, que era inactivo en las condiciones experimentales. También en este caso, los cambios

10 observados no parecían causados sólo por una densidad electrónica reducida del anillo de imidazol debido al efecto mesomérico negativo del grupo fenilo, porque también el grupo trimetilsililo voluminoso, que exhibe un efecto inductivo positivo, mostraba una unión reducida comparado

15 con otros residuos. De forma interesante, uno de los compuestos menos eficaces de este grupo era el 1-aminopropilimidazol. La baja eficacia de este compuesto está causada por el grupo amino básico, puesto que los compuestos estéricamente similares 1-metilimidazol y 1-

20 vinilimidazol mostraban una unión mejorada al sitio activo. Por tanto, el grupo amino cargado positivamente da cuenta del valor de K_i menor, un resultado que se corrobora por la comparación de los valores de K_i de histamina N- ω -acetilada (Tabla 3) e histamina (Tabla 4).

25 *Efecto de la derivatización 3,4 y 3,5.* Se mostró que los derivados de imidazol que contenían sustituyentes en posiciones 4(5) o ambas tenían una eficacia limitada para unión a la enzima. Se especificó el efecto de las sustituciones específicas mediante comparación de las

30 constantes de inhibición de L-histamina y los dos intermedios en la degradación biológica de histamina, 3-metil-4-histamina y 3-metil-5-histamina (Tabla 4). La L-histamina reveló un valor de K_i que era aproximadamente un orden de magnitud menor comparado con su contrapartida

35 acetilada. La mutilación de un nitrógeno dio como resultado una mejora considerable de la eficacia en el caso de 3-metil-4-histamina. La metilación que conduce a 3-metil-5-

histamina, sin embargo, dio como resultado una pérdida completa de actividad inhibidora. Por tanto, el efecto observado parece estar causado principalmente por un impedimento estérico de la unión debido a la derivatización del carbono adyacente a nitrógeno básico. Presuntamente, el nitrógeno básico desempeña un papel clave en la unión a la enzima.

Ejemplo 8: Formación de derivados de Aβ3-40/42

Se llevaron a cabo las medidas con dos secuencias peptídicas N-terminales cortas de Aβ3-40/42, [Gln³]-Aβ1-11 (secuencia: DAQFRHDSGYE) y [Gln³]Aβ3-11, que contiene un residuo de glutamina en lugar de ácido glutámico en la tercera posición. Se ensayó la escisión por DP IV y la ciclación del residuo de glutamina N-terminal por QC de los dos péptidos usando espectrometría de masas MALDI-TOF. Se llevaron a cabo las medidas usando DP IV purificada (de riñón porcino) u homogeneizado de pituitaria porcina bruta como fuentes de QC, así como para ambas enzimas para medidas de catálisis consecutiva.

Resultados

1. *Formación de [Gln³]Aβ3-11a a partir de [Gln³]Aβ1-11a catalizada por DP IV y su prevención por el inhibidor de DP IV Val-pirrolidida (Val-Pyrr)*

La actividad de DP IV o similar a DP IV es escindir [Gln³]Aβ1-11a con formación de [Gln³]Aβ3-11a (Figura 7). El residuo de la tercera posición no está cubierto por esta escisión y por lo tanto se vuelve accesible para modificación por otras enzimas, concretamente QC. Como se esperaba, la catálisis puede evitarse completamente por Val-Pyrr (Figura 8).

2. *Formación de [pGlu³]Aβ3-11a a partir de [Gln³]Aβ3-11a mediante catálisis de QC en homogeneizado de pituitaria y prevención por 1,10-fenantrolina*

La glutaminil ciclasa presente en el homogeneizado de pituitaria porcina cataliza la conversión de [Gln³]Aβ3-11 en [pGlu³]Aβ3-11a (Figura 9). Se inhibió la formación de [pGlu³]Aβ3-11a mediante la adición de 1,10-fenantrolina

(Figura 10).

3. *Catálisis consecutiva de DP IV y QC que da como resultado la formación de [pGlu³]Aβ3-11a y la prevención por Val-Pyrr y 1,10-fenantrolina*

5 La formación de [pGlu³]Aβ3-11a a partir de [Gln³]Aβ1-11a tiene lugar después de la catálisis consecutiva por DP IV y QC, medida en homogeneizado bruto de pituitaria porcina con DP IV añadida de riñón porcino (Figura 11). El [pGlu³]Aβ3-11a no se formó cuando se añadió el inhibidor de QC 1,10-fenantrolina (Figura 12) o el inhibidor de DP IV Val-Pyrr (Figura 13). La baja aparición de [pGlu³]Aβ3-11a es debida a la escisión con aminopeptidasa y la posterior ciclación del residuo de glutamina, también indicada por la formación de [Gln³]Aβ2-11a.

15 4. *Formación de [pGlu³]Aβ3-11a en homogeneizado de pituitaria bruto mediante catálisis de aminopeptidasa(s).*

Debido a la formación de [pGlu³]Aβ3-11a que no era dependiente de la catálisis de DP IV, se investigó la degradación de [Gln³]Aβ1-11a en homogeneizado de pituitaria bruto sin DP IV añadida (Figura 14). Como se esperaba a partir de los datos de la sección 4, se observó la formación de [pGlu³]Aβ3-11a. Los datos muestran que la degradación de [Gln³]Aβ1-11a puede catalizarse también por aminopeptidasa(s), dando como resultado [pGlu³]Aβ3-11a. Por tanto, los resultados muestran que la formación de piroglutamilo es un punto final de la degradación peptídica N-terminal en este tejido, apoyando adicionalmente el papel de la QC en la formación de placa.

25 **Ejemplo 9: Recambio de [Gln³]Aβ3-11a; 3-21a y 3-40 por QC humana recombinante**

30 Todos los péptidos derivados de [Gln³]Aβ ensayados se convirtieron eficazmente por QC humana en las formas de piroglutamilo correspondientes (Tabla 8). Debido a la mala solubilidad de [Gln³]Aβ3-21a y [Gln³]Aβ3-40 en disolución acuosa, se llevaron a cabo las determinaciones en presencia de 1% de DMSO. Sin embargo, la mejor solubilidad de [Gln³]Aβ3-11a, permitió el análisis cinético del recambio

catalizado por QC en presencia y ausencia de DMSO (Tabla 8). Tomada en conjunto, la investigación de los péptidos A β como sustratos de QC con longitud de cadena de 8, 18 y 37 aminoácidos (véase la Tabla 8) confirmó la observación de que la actividad de QC humana aumenta con la longitud de sus sustratos. En consecuencia, Gln¹-gastrina, Gln¹-neurotensina y Gln¹-GnRH están entre los mejores sustratos de QC teniendo en cuenta las constantes de especificidad. De forma similar, [Gln³]A β 3-40 y glucagón, los sustratos de QC mayores investigados hasta ahora, exhibían constantes de velocidad de segundo orden altas (449 mM⁻¹s⁻¹ y 526 mM⁻¹s⁻¹ respectivamente) incluso en presencia de 1% de DMSO (Tabla 8).

De forma interesante, los parámetros cinéticos para la conversión de los péptidos amiloides investigados no cambiaron drásticamente al aumentar el tamaño, sugiriendo efectos sólo moderados de la parte C-terminal de A β sobre la catálisis de QC. Por lo tanto, debido a la mejor solubilidad y manejo experimental, las investigaciones adicionales referentes al procesamiento con aminopeptidasa N-terminal de estos péptidos se efectuaron usando los fragmentos menores de A β , [Gln³]A β 1-11a, [Gln³]A β 3-11a y A β 3-11a.

Tabla 8: Parámetros cinéticos para la conversión de péptidos que contienen Gln N-terminal mediante QC humana recombinante en disolución tampón que contiene 1% de DMSO

Péptido	K _M (μ M)	k _{cat} (s ⁻¹)	k _{cat} /K _M (mM ⁻¹ s ⁻¹)
[Gln ³]A β 3-11a	87 $\pm$ 3 [#]	55 $\pm$ 1 [#]	632 $\pm$ 10 [#]
[Gln ³]A β 3-11a	155 $\pm$ 4	41,4 $\pm$ 0,4	267 $\pm$ 4
[Gln ³]A β 3-21a	162 $\pm$ 12	62 $\pm$ 3	383 $\pm$ 10
[Gln ³]A β 3-40	89 $\pm$ 10	40 $\pm$ 2	449 $\pm$ 28
Glucagón (3-29)	19 $\pm$ 1	10,0 $\pm$ 0,2	526 $\pm$ 17

[#]determinado en ausencia de DMSO

Ejemplo 10: Recambio de A β 3-11a y A β 3-21a por QC humana recombinante

La incubación de A β 3-11a y A β 3-21a en presencia de QC reveló que, en contraposición con el trabajo anterior, los

péptidos que contienen glutamato pueden servir también como sustratos de QC (Figuras 15C y D). Se investigó la formación de [pGlu³]Aβ3-11a y [pGlu³]Aβ3-21a catalizada por QC a pH 5,2 y 6,5, respectivamente. Si se añadía el inhibidor de QC bencimidazol a la disolución antes de empezar el ensayo mediante la adición de QC, se suprimía la conversión de sustrato dando como resultado [pGlu³]Aβ3-11a o [pGlu³]Aβ3-21a (Figuras 15E y F). Si la QC se hervía antes de la adición, la formación de péptidos pGlu era despreciable (Figuras 15A y B).

Ejemplo 11: Dependencia del pH de la ciclación de Gln-βNA y Glu-βNA catalizada por QC de papaya

La QC de papaya convertía Glu-βNA en un intervalo de concentración de hasta 2 mM (que estaba limitado por la solubilidad del sustrato) según la cinética de Michaelis-Menten (Figura 16). La inspección de los diagramas de recambio frente a concentración de sustrato para la conversión de Glu-βNA catalizada por QC, estudiada entre pH 6,1 y 8,5, reveló que para este sustrato de Glu cambiaban ambos parámetros, K_M y k_{cat} , de manera dependiente del pH (Figura 16). Esto está en contraposición con la ciclación de glutamina catalizada por QC anteriormente descrita, para la que se observaron sólo cambios de K_M en el intervalo de pH dado (Gololobov, M. Y., Song, I., Wang, W. y Bateman, R. C. (1994) Arch. Biochem. Biophys. 309, 300-307).

Posteriormente, para estudiar el impacto de la concentración protónica durante la ciclación de Glu y Gln, se investigó la dependencia del pH de la ciclación de Glu-βNA y Gln-βNA en condiciones de ley de primer orden (concretamente, concentraciones de sustrato muy por debajo de los valores de K_M) (Figura 17). La ciclación de glutamina tiene un pH óptimo de pH 8,0, en contraposición con la ciclación de ácido glutámico que mostraba un pH óptimo de pH 6,0.

Aunque las constantes de especificidad a los pH óptimos respectivos difieren aproximadamente 80.000 veces, la relación de actividad de QC frente a EC aproximadamente

a pH 6,0 es de sólo aproximadamente 8.000.

La formación de pGlu no enzimática a partir de Gln-βNA investigada a pH 6,0 se siguió durante 4 semanas y reveló una constante de reacción primer orden de $1,2 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$. Sin embargo, durante el mismo periodo de tiempo, no se formó pGlu-βNA a partir de Glu-βNA, permitiendo estimar una constante de velocidad limitante para el recambio de $1,0 \times 10^{-9} \text{ s}^{-1}$.

Ejemplo 12: Procedimientos de inactivación/reactivación enzimática

Se inactivó una alícuota de QC humana (0,1-0,5 mg, 1 mg/ml) durante una noche mediante diálisis frente a un exceso de 3.000 veces de 1,10-fenantrolina 5 mM o ácido dipicolínico 5 mM en Bis-Tris/HCl 0,05 M, pH 6,8. Posteriormente, se retiró cuidadosamente el agente inactivante mediante diálisis (3 ciclos, 2.000 veces de exceso) de las muestras frente a Bis-Tris/HCl 0,05 M, pH 6,8, que contenía EDTA 1 mM. Se efectuaron experimentos de reactivación a temperatura ambiente durante 15 minutos usando iones de Zn^{++} , Mn^{++} , Ni^{++} , Ca^{++} , K^{+} y Co^{++} a concentraciones de 1,0, 0,5, 0,25 mM en Bis-Tris 0,025 M, pH 6,8, que contenía EDTA 0,5 mM. Se efectuaron ensayos de actividad de QC en Tris/HCl 0,05 M, pH 8,0, que contenía EDTA 2 mM, para evitar una reactivación rápida por trazas de iones metálicos presentes en las disoluciones tampón.

Se ha descrito ya la inhibición de QC porcina por 1,10-fenantrolina (Busby, W. H. J. y col. 1987 J. Biol. Chem. 262, 8532-8536, Bateman, R. C. J. y col. 2001 Biochemistry 40). Sin embargo, el hecho de que el EDTA haya mostrado tener un efecto activador sobre la catálisis de QC, sugería que la inhibición por fenantrolina no es debida a la quelación metálica (Busby, W. H. J. y col. 1987 J. Biol. Chem. 262, 8532-8536, Bateman, R. C. J. y col. 2001 Biochemistry 40). También, además de inhibirse por 1,10-fenantrolina, la ciclación de sustrato catalizada por QC humana se anuló en presencia de ácido dipicolínico y 8-hidroxiquinolina, otros inhibidores de metaloenzimas. Estos

quelantes inhibían la QC de manera competitiva y dependiente del tiempo, concretamente, se encontró que la actividad inicial ya inhibida competitivamente se reducía adicionalmente después de una incubación prolongada con los compuestos (Figuras 18, 19). De forma interesante, el EDTA no mostraba una inhibición notable independientemente del tiempo de incubación o cualquier otra condición.

La QC humana estaba casi completamente inactivada después de una diálisis extensiva frente a 1,10-fenantrolina 5 mM o ácido dipicolínico 5 mM. Después de diálisis repetida durante una noche frente a disoluciones tampón exentas de quelante, se reactivó parcialmente la actividad de QC hasta 50-60%. Sin embargo, cuando se dializó frente a tampones que contenían EDTA 1 mM, no se observó reactivación.

Se consiguió la restauración casi completa de la actividad de QC después de inactivación con ácido dipicolínico o 1,10-fenantrolina incubando la proteína durante 10 minutos con ZnSO_4 0,5 mM en presencia de EDTA 0,5 mM (Figura 20). Se obtuvo una restauración parcial similar de la actividad de QC usando iones Co^{++} y Mn^{++} para reactivación. Incluso en presencia de Zn^{++} 0,25 mM, fue posible una reactivación de hasta el 25% de la actividad original. No se observó reactivación aplicando iones Ni^{++} , Ca^{++} ni K^+ . De forma similar, la incubación de QC totalmente activa con estos iones no tenía efecto sobre la actividad enzimática.

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica para administración parenteral, entérica u oral, que comprende al menos un
5 inhibidor de glutaminil ciclasa o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
2. La composición farmacéutica según la reivindicación 1, que comprende adicionalmente un inhibidor de DP IV o una
10 enzima tipo DP IV, en la que la enzima tipo DP IV se selecciona de proteína α activadora de fibroblastos, dipeptidil peptidasa IV β , proteína tipo dipeptidil aminopeptidasa, dipeptidasa ácida N-acetilada- α -ligada, dipeptidasa de prolina de células quiescentes, dipeptidil
15 peptidasa II, atractina y DPP 8, DP 6, DPL 2, DPP 9 y DPP 10.
3. Uso de una composición farmacéutica según las reivindicaciones 1 ó 2 para la preparación de un
20 medicamento para la prevención o el tratamiento de una enfermedad seleccionada de enfermedad de Alzheimer y síndrome de Down.
4. Una composición farmacéutica según las
25 reivindicaciones 1 ó 2 para el tratamiento de una enfermedad seleccionada de enfermedad de Alzheimer y síndrome de Down.
5. Uso de un inhibidor de glutaminil ciclasa, o una sal
30 farmacéuticamente aceptable del mismo, para la preparación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de una enfermedad seleccionada de enfermedad de Alzheimer y síndrome de Down.
- 35 6. Un inhibidor de glutaminil ciclasa, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para la prevención o el tratamiento de una enfermedad seleccionada de enfermedad

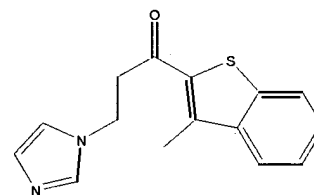
de Alzheimer y síndrome de Down.

7. El uso o el inhibidor de glutaminil ciclasa según las reivindicaciones 5 ó 6, en los que el inhibidor de glutaminil ciclasa se usa en combinación con un inhibidor de DP IV o una enzima tipo DP IV, en los que la enzima tipo DP IV se selecciona de proteína α activadora de fibroblastos, dipeptidil peptidasa IV β , proteína tipo dipeptidil aminopeptidasa, dipeptidasa ácida N-acetilada- α -ligada, dipeptidasa de prolina de células quiescentes, dipeptidil peptidasa II, atractina y DPP 8, DP 6, DPL 2, DPP 9 y DPP 10.

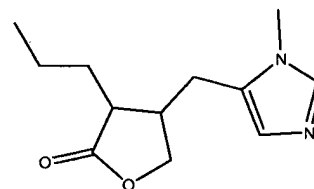
8. La composición farmacéutica o el inhibidor de glutaminil ciclasa o el uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en los que el inhibidor de glutaminil ciclasa es un inhibidor competitivo.

9. La composición farmacéutica o el inhibidor de glutaminil ciclasa o el uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en los que el inhibidor de glutaminil ciclasa se selecciona de

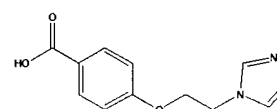
3-(1*H*-Imidazol-1-il)-1-(3-metilbenzo[b]tiofen-2-il)propan-1-ona



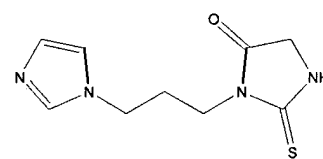
4-[(1-Metil-1*H*-imidazol-5-il)metil]-3-propildihidrofuran-2-(3*H*)-ona



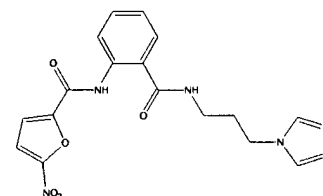
Ácido 4-[(2-1*H*-imidazol-1-il)etoxi]-benzoico



3-[3-(1H-imidazol-1-il)propil]-2-tioxiimidazolidin-4-ona



5-Nitro-2-[2-([3-(1H-imidazol-1-il)propil]amino)carbonil)fenil]furamida



1-Bencilimidazol

10. El inhibidor de glutaminil ciclasa o el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 3 y 5 a 9, caracterizados por que se inhibe la conversión de residuos de ácido glutámico o glutamina N-terminales en residuos de ácido piroglutámico de al menos un sustrato de glutaminil ciclasa seleccionado de $A\beta$ 3-40/42, $[Gln^3]A\beta$ 3-40/42, $[Glu^{11}]A\beta$ 11-40/42 y $[Gln^{11}]A\beta$ 11-40/42.
11. El inhibidor de glutaminil ciclasa o el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 3 y 7 a 10, en los que se bloquea la actividad que genera H-isoAsp-Ala-OH de la enzima tipo DP IV.
12. El inhibidor de glutaminil ciclasa o el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 3 y 7 a 11, en los que la enzima tipo DP IV es DP II.
13. El inhibidor de glutaminil ciclasa o el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 3 y 7 a 10, en los que el inhibidor de DP IV se selecciona del grupo constituido por L-treo-isoleuciltiazolidina, L-allo-isoleuciltiazolidina, L-treo-isoleucilpirrolidina, L-allo-isoleucilpirrolidina, NVP-DPP728A (1-[[[2-[[5-cianopiridin-2-il]amino]etil]amino]acetil]-2-ciano-(S)-pirrolidina), LAF-237 (1-[(3-hidroxiadamant-1-ilamino)acetil]pirrolidin-2(S)-carbonitrilo), TSL-225 (ácido triptofil-1,2,3,4-

tetrahidroisoquinolin-3-carboxílico), FE-999011, N-valilprolilo, O-benzoilhidroxilamina, alanilpirrolidina, H-Asn-pirrolidina, H-Asn-tiazolidina, H-Asp-pirrolidina, H-Asp-tiazolidina, H-Asp(NHOH)-pirrolidina, H-Asp(NHOH)-tiazolidina, H-Glu-pirrolidina, H-Glu-tiazolidina, H-Glu(NHOH)-pirrolidina, H-Glu(NHOH)-tiazolidina, H-His-pirrolidina, H-His-tiazolidina, H-Pro-pirrolidina, H-Pro-tiazolidina, H-Ile-azididina, H-Ile-pirrolidina, H-L-allo-lle-tiazolidina, H-Val-pirrolidina y H-Val-tiazolidina, ácido 2-aminoctanoico-Pro-Ile, Abu-Pro-Ile, Aib-Pro-Ile, Aze-Pro-Ile, Cha-Pro-Ile, Ile-Hyp-Ile, Ile-Pro-allo-Ile, Ile-Pro-*terc*-butil-Gly, Ile-Pro-Val, Nle-Pro-Ile, Nva-Pro-Ile, Orn-Pro-Ile, Phe-Pro-Ile, Phg-Pro-Ile, Pip-Pro-Ile, Ser(Bzl)-Pro-Ile, Ser(P)-Pro-Ile, Ser-Pro-Ile, *terc*-butil-Gly-Pro-D-Val, *terc*-butil-Gly-Pro-Gly, *terc*-butil-Gly-Pro-Ile, *terc*-butil-Gly-Pro-Ile-amida, *terc*-butil-Gly-Pro-*terc*-butil-Gly, *terc*-butil-Gly-Pro-Val, Thr-Pro-Ile, Tic-Pro-Ile, Trp-Pro-Ile, Tyr(P)-Pro-Ile, Tyr-Pro-allo-Ile, Val-Pro-allo-Ile, Val-Pro-*terc*-butil-Gly, Val-Pro-Val o una sal farmacéuticamente aceptable los mismos.

14. El inhibidor de glutaminil ciclasa o el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 3 y 7 a 10, en los que el inhibidor de DP IV se selecciona del grupo constituido por

bromhidrato de 2-metilcarbonil-1-N-[(L)-alanil-(L)-valinil]-(2S)-pirrolidina,
 bromhidrato de 2-metilcarbonil-1-N-[(L)-valinil-(L)-prolil-(L)-valinil]-(2S)-pirrolidina,
 bromhidrato de 2-[(acetiloximetil)carbonil]-1-N-[(L)-alanil-(L)-valinil]-(2S)-pirrolidina,
 bromhidrato de 2-[(benzoiloximetil)carbonil]-1-N-[[{(L)-alanil}-(L)-valinil]-(2S)-pirrolidina,
 2-[[{(2,6-diclorobencil)tiometil}carbonil]-1-N-[[{(L)-alanil}-(L)-valinil]-(2S)-pirrolidina,
 bromhidrato de 2-[(benzoiloximetil)carbonil]-1-N-[glicil-(L)-valinil]-(2S)-pirrolidina,

trifluoroacetato de 2-[[[1,3]-tiazoltiazol-2-il)carbonil]-1-*N*-[(L)-alanil]-(L)-valinil]-(2*S*)-pirrolidina,

5 trifluoroacetato de 2-[(benzotiazoltiazol-2-il)carbonil]-1-*N*-[*N*-{(L)-alanil}-(L)-valinil]-(2*S*)-pirrolidina,

trifluoroacetato de 2-[(benzotiazoltiazol-2-il)carbonil]-1-*N*-[(L)-alanil]glicil]-(2*S*)-pirrolidina,

10 trifluoroacetato de 2-[(piridin-2-il)carbonil]-1-*N*-[*N*-{(L)-alanil}-(L)-valinil]-(2*S*)-pirrolidina

cloruro de 1-ciclopentil-3-metil-1-oxo-2-pentanaminio,

cloruro de 1-ciclopentil-3-metil-1-oxo-2-butanaminio,

cloruro de 1-ciclopentil-3,3-dimetil-1-oxo-2-butanaminio,

15 cloruro de 1-ciclohexil-3,3-dimetil-1-oxo-2-butanaminio,

cloruro de 3-(ciclopentilcarbonil)-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolinio,

20 cloruro de *N*-(2-ciclopentil-2-oxoetil)ciclohexanaminio u otras sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

15. La composición farmacéutica o el inhibidor de glutaminil ciclasa o el uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en los que el inhibidor de glutaminil ciclasa se une al ión metálico unido al sitio activo de glutaminil ciclasa.

25

Figura 1

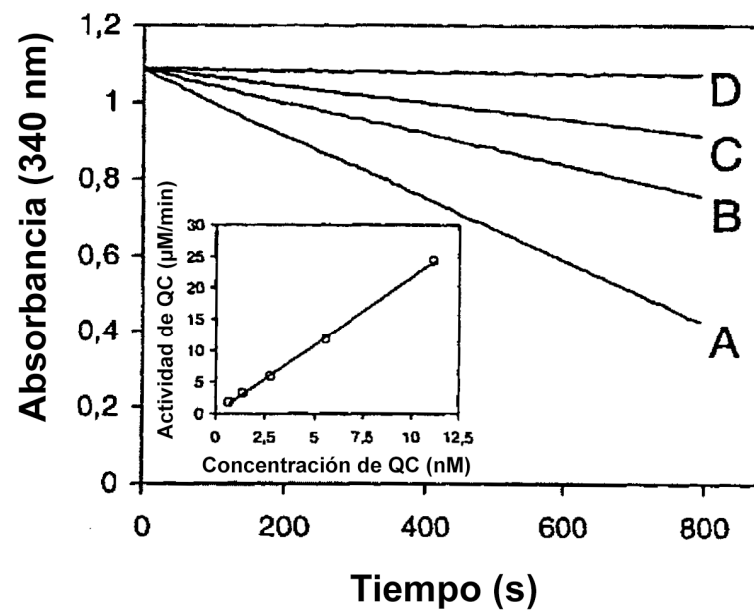


Figura 2

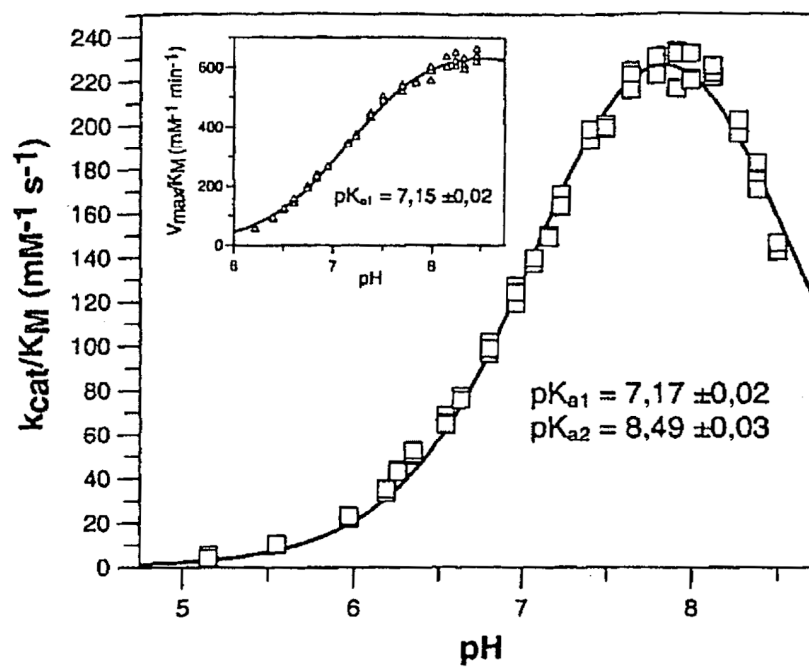


Figura 3

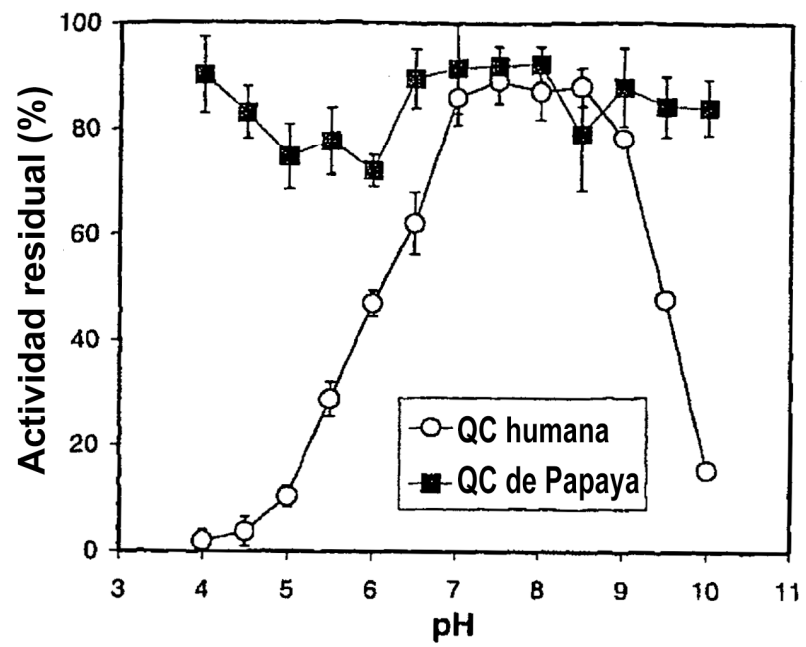


Figura 4

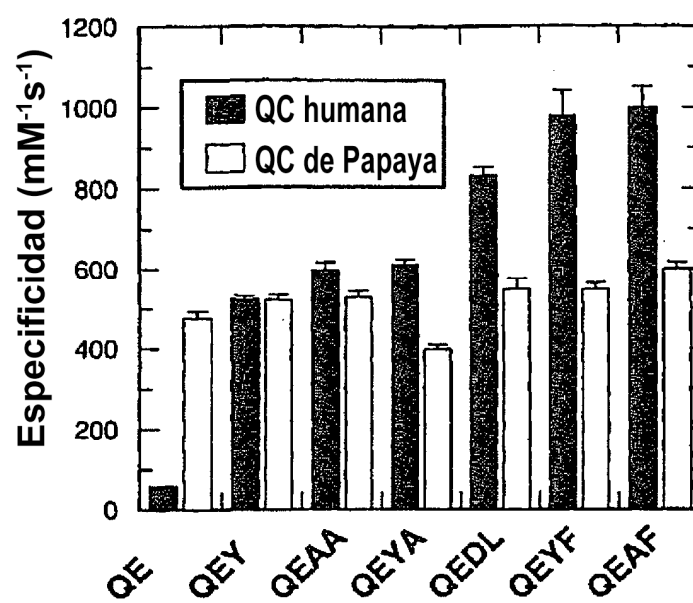


Figura 5

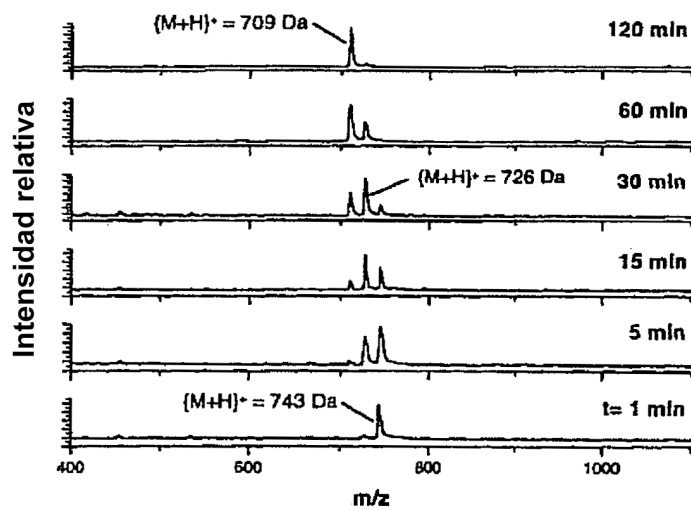


Figura 6

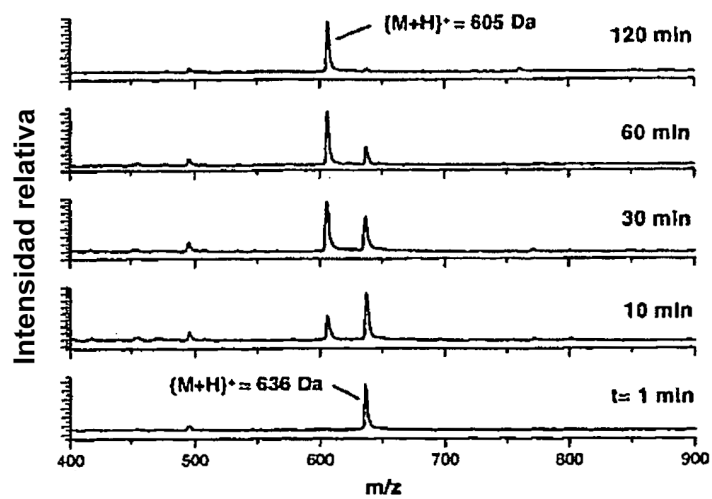


Figura 7

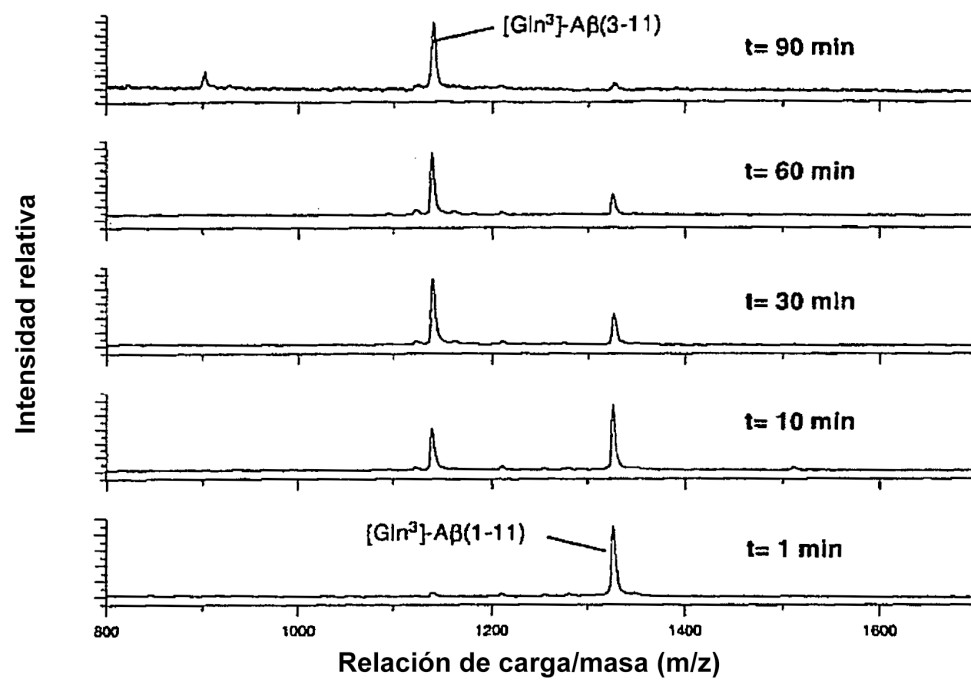


Figura 8

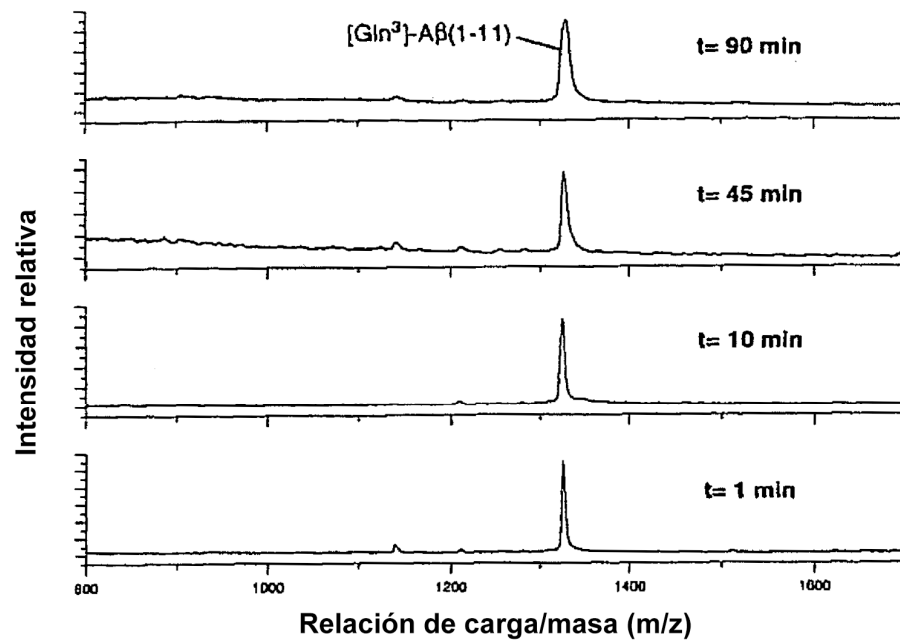


Figura 9

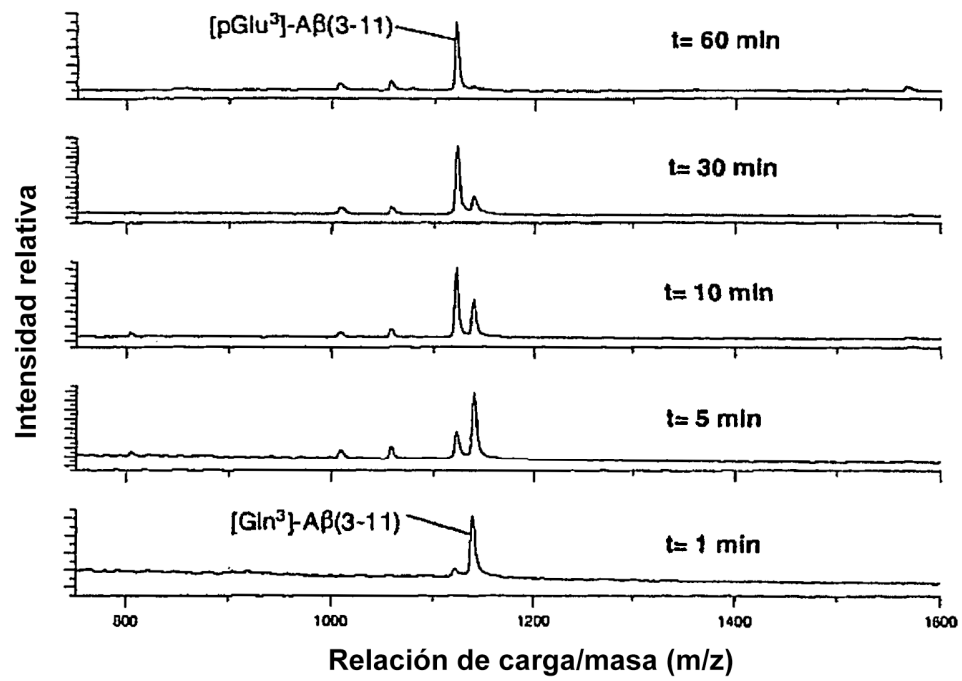


Figura 10

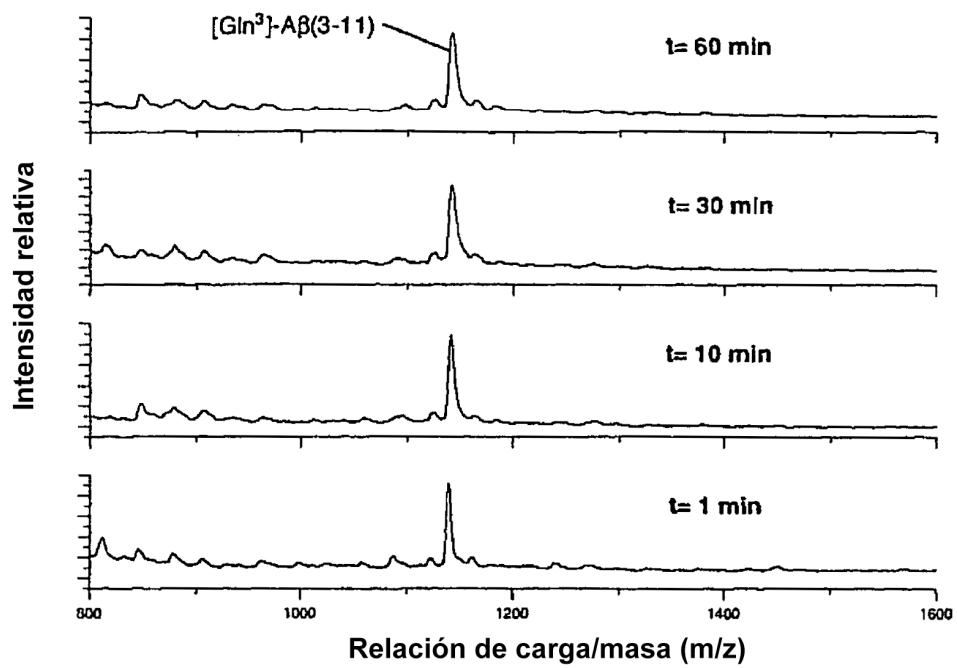


Figura 11

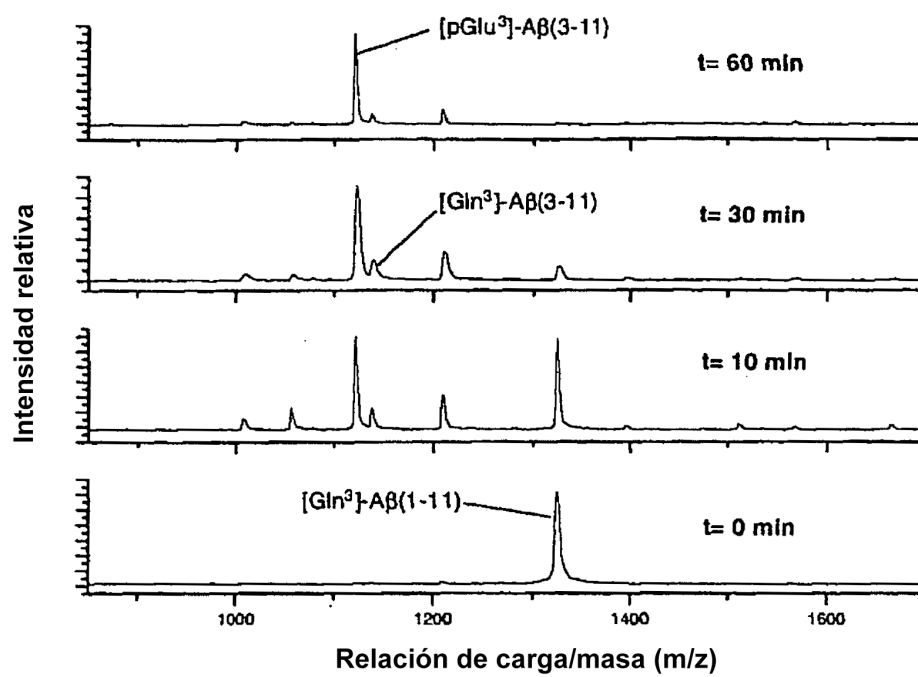


Figura 12

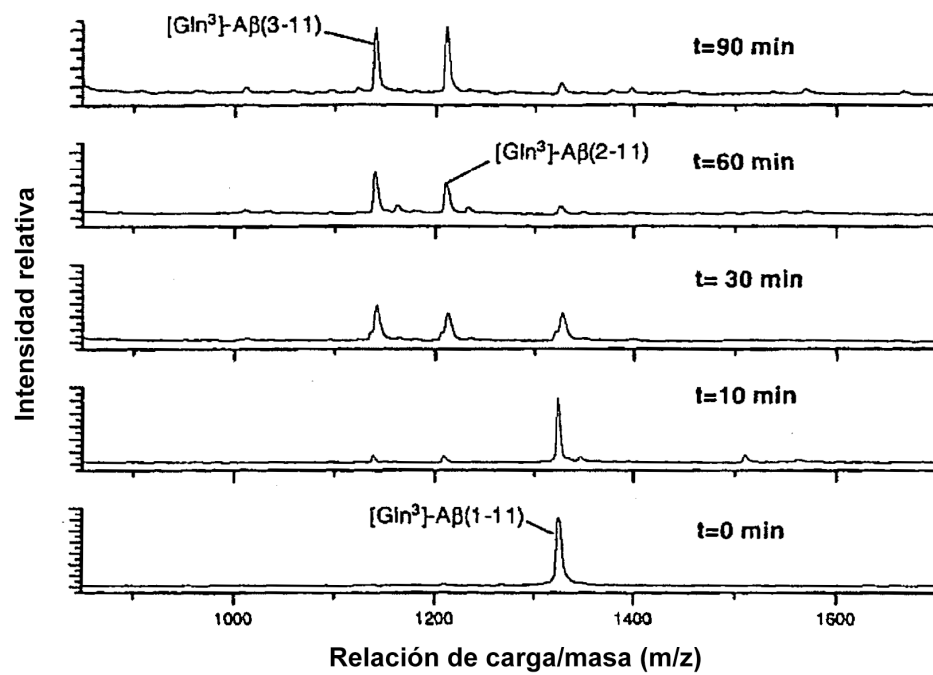


Figura 13

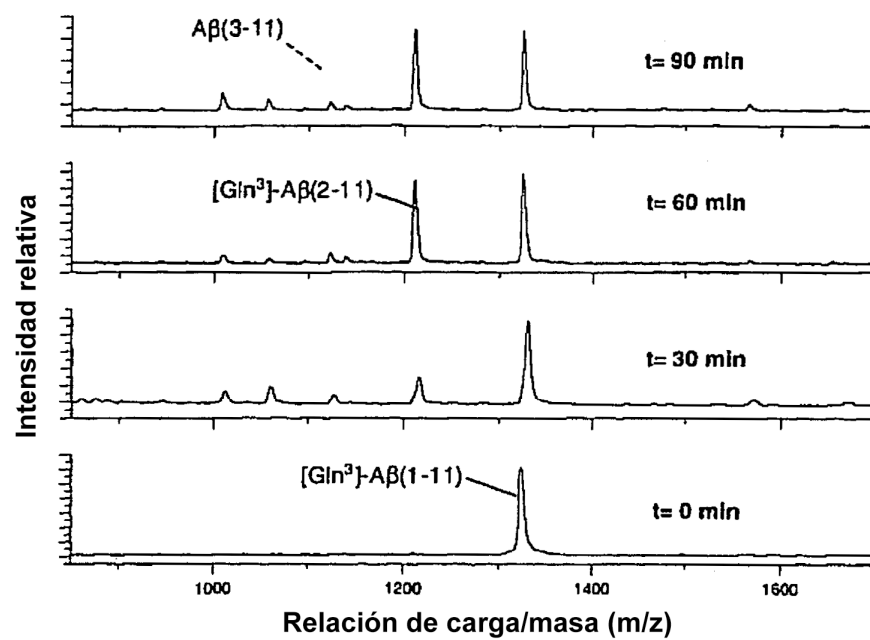


Figura 14

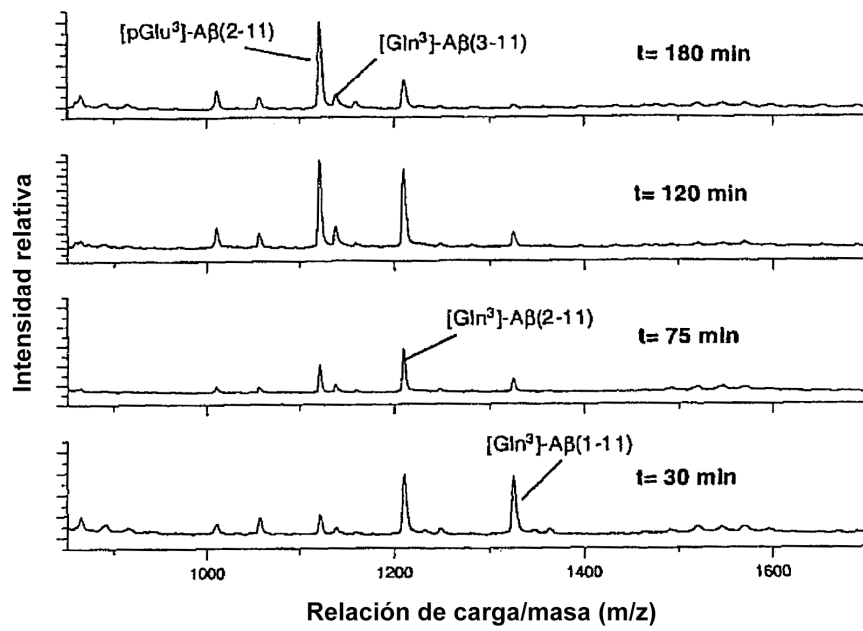


Figura 15

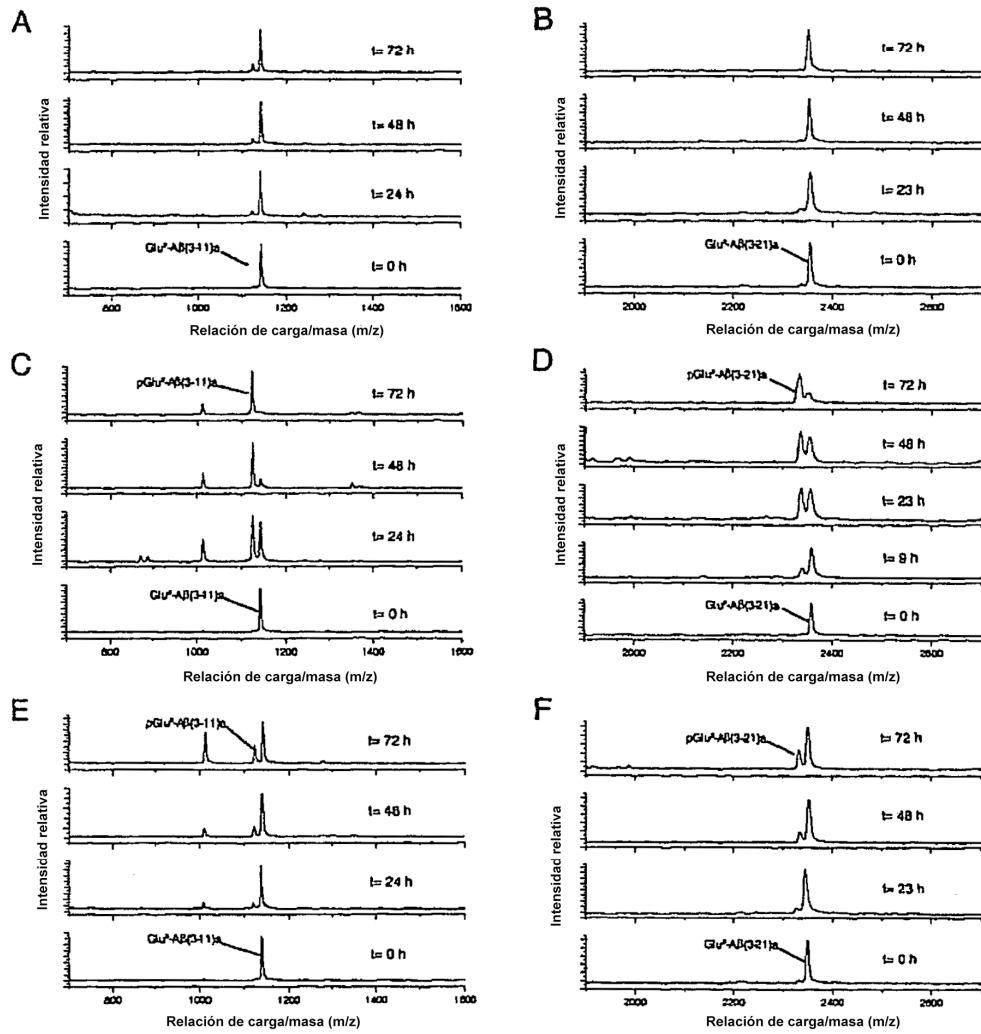


Figura 16

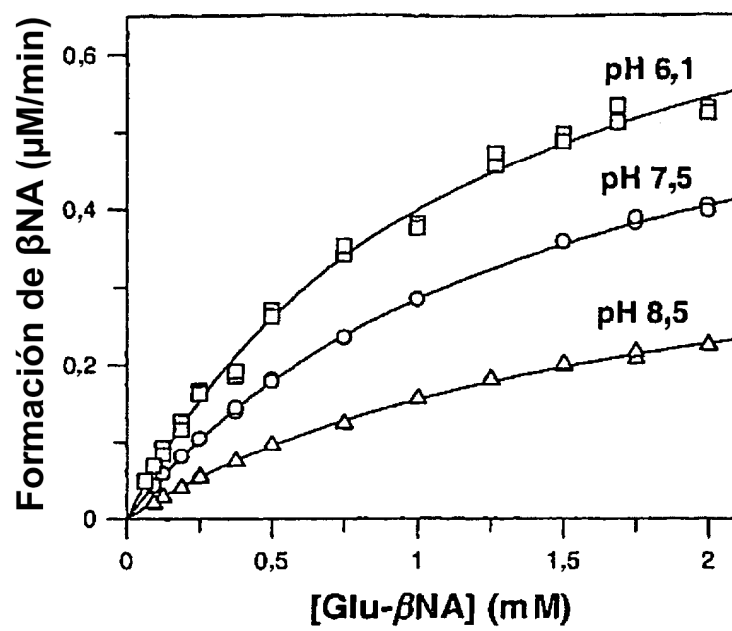


Figura 17

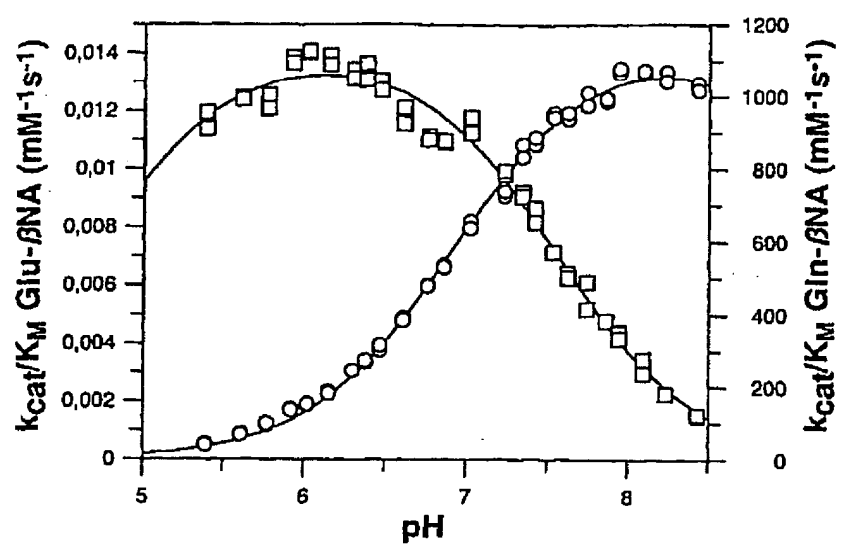


Figura 18

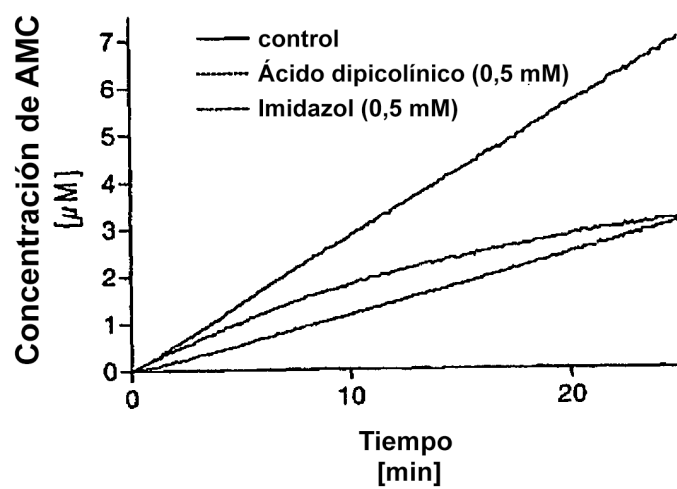


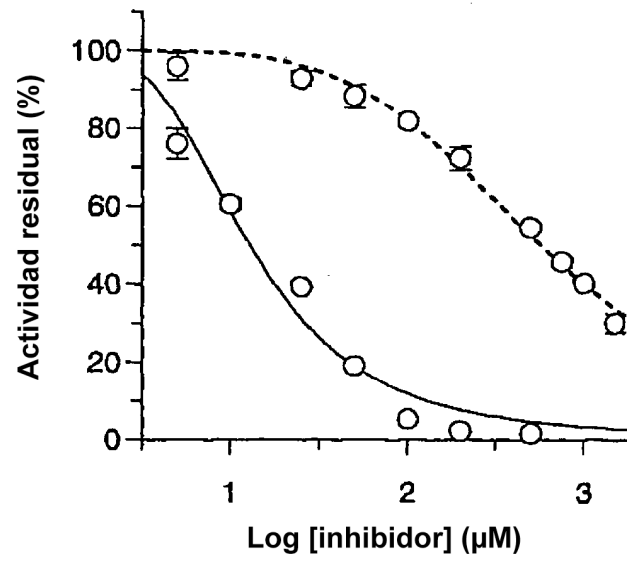
Figura 19

Figura 20

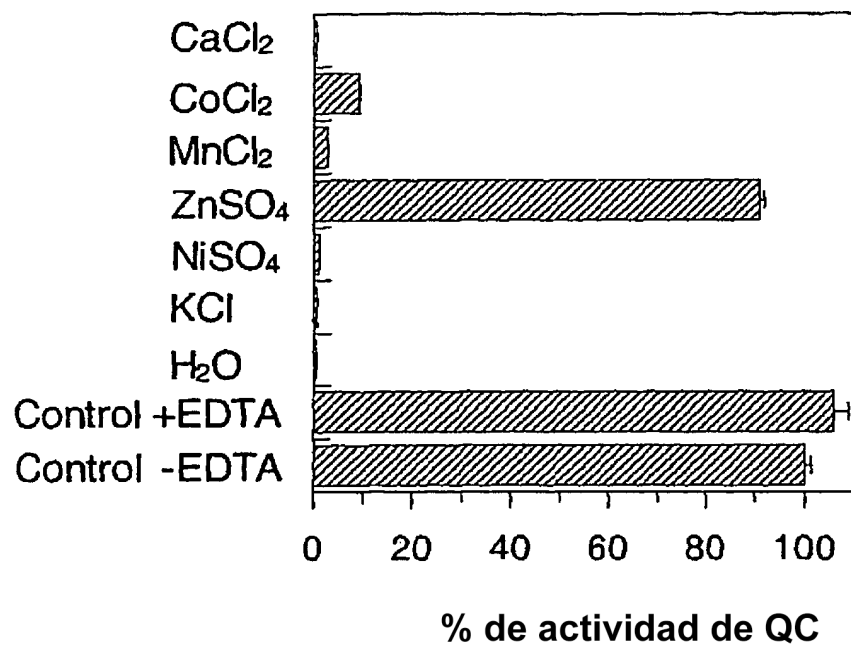


Figura 21

```

hQC      MAGGRHRRVVGTLHLLLLVAALPWASRGVSPSASAWPEEKNYHQPAILNSSALRQIAEGT
SGAP     -----APDIPLANVKAHLTQLS
hgCP II  -----ANEYAYRRGIAEAVGLPSIPVHPIGYYDAQ-K
              * *           : : .

hQC      SISEMWQNDLQPLLIERYPGSPGSAARQHIMQRIQRLQADWVLEIDTFLSQTPTYGYRSF
SGAP     TIAAN--NGGN-----RAHGRPGYKASVDYVKAKLD--AAGYTTTLQQFTSGGATGYNLI
hgCP II  LLEKM--GGSAP---PDSSWRGSLKVPYNVGPFGFTGNFSTQKVKMHIHSTNEVTRIYNVI
              : ..           . . :           : . . . * . :

hQC      SNIISTLNPTAKRHLVLACYYDSKYFSHWNNRVFVGATDSAVPCAMLELAR---ALDKK
SGAP     ANWPG-GDP--NKVLMAGAHLLD--VSSG-----AGINDNGSGSAAVLETAL---AVSRA
hgCP II  GTLRGAVEP--DRYVILGGHRRD5-----W----VFGGIDPQSGAAVVHEIVRSFGTLKKE
              . . . : * . : : . * * *           * * . * : * . : : :

hQC      LLSLKTVSDSKPDLSLQLIFFDGEEAFLHWSPQDSLYGSRHLAAKMASTPHFPGARGTSQ
SGAP     GY--Q-----PDKHLRFAWWGAELLGLIGS---KPY-----VNNLPSADR--SK
hgCP II  GW--R-----PRRTILPASWDAEEFGLIGS---TEW-----AEENSR-LLQ
              :           * : : : . * * * * . :           * :

hQC      LHGMDLLVLLDLIGAPNPTFPNFF--PNSARWFERLQAIEHELH--ELGLLKDHSLEGR
SGAP     LAG---YLNFDMIGSPNPGYFVYDDDPVIEKTFKNYFAGLNVPT--EIETEGDGRSDHA
hgCP II  ERG-VAYINADSSIEGNYTLRVDCT-PLMYSLVHNLTKELKSPDEGFEGKSLYESWTKKS
              * : * * *           * . . : * : .

hQC      Y---FQNYSY---G-G-----VIQDD-HIPFLRRGVP-VLHLIPSPFPEEWHTMDDNEE
SGAP     P---FKNVGVP--VG-G-----LFTGAGYTKSAAQAQK-WGGTAGQAFDRCYHSSCDSLS
hgCP II  PSPEFSGMPRISKLGSGNDFEVFFQRLGIASGRARYTKNWETNKFSGYP-LYHSVYETYE
              * . . * *           . :           : * : : : . .

hQC      NLDESTID-N-LNKILQVFVLEYLHL----
SGAP     NINDTALDRNSDAAAHAIWTLSSGTGEPPPT
hgCP II  -LVEKFYD--PMFKYHLTVAQVRGGMVFEL
              : : . *           .

```